



**Tânia Gomes Lucas**

Licenciatura em Biologia Celular e Molecular

**Estudos de *folding* e efeito de  
chaperões químicos e moleculares em  
proteínas envolvidas na  $\beta$ -oxidação de  
ácidos gordos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica  
Estrutural e Funcional

Orientador: Doutor Cláudio M. Gomes, ITQB-UNL  
Co-orientador: Doutora Bárbara J. Henriques, ITQB-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares  
Arguente: Prof. Doutora Ana Paula Costa dos Santos Peralta Leandro  
Vogais: Prof. Doutor Cláudio Emanuel Moreira Gomes  
Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro, 2011**



Estudos de *folding* e efeito de chaperões químicos e moleculares em proteínas da  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos  
Tânia Lucas

2011



**Tânia Gomes Lucas**

Licenciatura em Biologia Celular e Molecular

**Estudos de *folding* e efeito de  
chaperões químicos e moleculares em  
proteínas envolvidas na  $\beta$ -oxidação de  
ácidos gordos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica  
Estrutural e Funcional

Orientador: Doutor Cláudio M. Gomes, ITQB-UNL  
Co-orientador: Doutora Bárbara J. Henriques, ITQB-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares  
Arguente: Prof. Doutora Ana Paula Costa dos Santos Peralta Leandro  
Vogais: Prof. Doutor Cláudio Emanuel Moreira Gomes  
Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2011

**Estudos de *folding* e efeito de chaperões químicos e moleculares em proteínas envolvidas na  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos**

Parte dos resultados apresentados nesta dissertação encontram-se publicados em:

Lucas, T.G., Henriques, B.J., Rodrigues, J.V., Bross, P., Gregersen, N., Gomes, C.M., *Cofactors and metabolites as potential stabilizers of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases*, Biochim Biophys Acta - Molecular Basis of Disease, 2011. 1812 (12): p. 1658-1663.

Copyright Tânia Gomes Lucas, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Doutor Cláudio M. Gomes, a oportunidade de aprendizagem e crescimento científico. Agradeço o sentido crítico e persistência, que sempre soube inculcar, e constante incentivo que me manteve sempre motivada durante todo o trabalho. Estou totalmente agradecida por este suporte.

Aos Doutores Niels Gregersen e Peter Bross (Hospital universitário de Aarhus, Dinamarca) agradeço as discussões e opiniões trocadas na parte do trabalho que se encontra publicado em: Lucas, T.G., Henriques, B.J., Rodrigues, J.V., Bross, P., Gregersen, N., Gomes, C.M., *Cofactors and metabolites as potential stabilizers of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases*, Biochim Biophys Acta - Molecular Basis of Disease, 2011. 1812 (12): p. 1658-1663.

Ao Doutor Mark Fisher (Universidade de Kansas, Kansas City, USA) agradeço a partilha de GroEL imobilizada em esferas e opiniões trocadas.

Aos meus colegas e amigos do grupo “Bioquímica de proteínas, estabilidade e *folding*” agradeço todo o companheirismo, amizade, disponibilidade, boa disposição, discussões científicas e o ambiente de trabalho maravilhoso. Sónia Leal, Hugo Botelho, Sofia Carvalho e Pedro Fernandes. E um obrigado em especial à Bárbara Henriques, por toda a paciência, disponibilidade, acolhimento; conhecimento e discussão científica, e críticas construtivas. Um muito obrigado por toda a orientação e por tudo... Agradeço também em especial ao João Rodrigues por todas as discussões científicas e conhecimento partilhado.

Agradeço a todos os meus amigos de fora do ITQB. Em especial, um grande obrigado à minha amiga Joana Pereira, por todo o encorajamento, amizade e bom humor... Obrigada por tudo, sem ti tudo teria sido muito mais difícil. E à minha amiga Carolina Matias, por todo o apoio, amizade, disponibilidade e positivismo transmitido.

Ao Jorge Santos um grande obrigado por seres a pessoa que és e por tudo...

Aos meus pais, avó e irmã, por todo o suporte, amor e apoio, e por acreditarem em mim.



## RESUMO

O *misfolding* proteico caracteriza um número de doenças metabólicas, nas quais defeitos da oxidação de ácidos gordos estão incluídos. Condições de severidade moderada destas doenças resultam frequentemente da destabilização conformacional e diminuição da função enzimática das proteínas afectadas. Pequenas moléculas com capacidade para aumentar os níveis funcionais dessas proteínas até um certo limiar da doença, são assim ferramentas valiosas no desenho de drogas efectivas. Neste trabalho investigou-se o efeito de cofactores e metabolitos mitocondriais como potenciais estabilizadores de duas acil-CoA desidrogenases da  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos: a acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCAD) e cadeia média (MCAD); bem como a glutaril-CoA desidrogenase (GCD) envolvida no metabolismo da lisina e triptofano. Os resultados obtidos demonstraram um aumento espectacular da estabilidade térmica destas enzimas, impedindo a perda de actividade enzimática durante a incubação de 1 hora a 40°C para concentrações de FAD próximas das fisiológicas. Um efeito claro foi também observado para os substratos preferidos, butiril-CoA e octanoil-CoA, respectivamente, para a SCAD e MCAD, mas não para a GCD. Em conclusão, a riboflavina pode ser benéfica durante episódios de febre em pacientes com deficiências na SCAD e MCAD, bem como GCD, e o tratamento com análogos de substratos poderá teoricamente alterar a actividade enzimática de algumas proteínas com dificuldades inerentes de *folding*.

Outra estratégia para minimizar o *misfolding* proteico envolve a chaperonina GroEL, que tem a capacidade de encapsular proteínas *misfolded* no seu interior permitindo o *refolding* proteico. Neste trabalho investigou-se a partição do mutante p.Asp128Asn da flavoproteína de transferência electrónica (ETF). Os resultados demonstraram partição, sugerindo que variantes conformacionais podem ser recuperadas na presença de chaperões moleculares, e suscitando a possibilidade deste papel pela homóloga mHsp60 mitocondrial. A ausência de partição na presença de TMAO e sarcosina sugere o potencial destes chaperões químicos na estabilização conformacional da proteína, eliminando a necessidade de *refolding* pela GroEL.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos, acil-CoA desidrogenases, ETF, substratos, FAD, GroEL





## ABSTRACT

Protein misfolding characterizes a number of metabolic diseases, in which fatty acid oxidation defects are included. Milder disease conditions frequently result from conformational destabilization and decreased enzymatic function of the affected proteins. Small molecules which have the ability to raise the functional levels of these proteins above a certain disease threshold are thus valuable tools for effective drug design. In this work we have investigated the effect of mitochondrial cofactors and metabolites as potential stabilizers in two  $\beta$ -oxidation acyl-CoA dehydrogenases: short chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) and medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) as well as glutaryl-CoA dehydrogenase, which is involved in lysine and tryptophan metabolism. We found that near physiological concentrations of FAD resulted in a spectacular enhancement of the thermal stabilities of these enzymes and prevented enzymatic activity loss during 1 hour incubation at 40°C. A clear effect of the respective substrate, which was additive to that of FAD was also observed for SCAD and MCAD but not for GCD. In conclusion, riboflavin may be beneficial during feverish crises in patients with SCAD and MCAD as well as in GCD deficiencies, and treatment with substrate analogues could theoretically enhance enzyme activity for some proteins with inherited folding difficulties.

Another strategy to minimize protein misfolding has involved the GroEL chaperonin, which has the ability to encapsulate misfolded proteins, allowing protein refolding. In this work, we have also investigated the partition of the variant of the electron transfer flavoprotein (ETF-p.Asp128Asn). Results show that partition into GroEL has taken place, suggesting that conformational variants can be effectively recovered by molecular chaperones and thus raising the possibility for a role for the mitochondrial counterpart of GroEL - mHsp60. The absence of partition in the presence of TMAO and sarcosine suggests the potential role of these chemicals chaperones in conformational stabilization of the protein, eliminating the need for refolding by GroEL.

**Keywords:** Fatty acid  $\beta$ -oxidation, acyl-CoA dehydrogenases, ETF, substrates, FAD, GroEL



## ÍNDICE GERAL

|                             |      |
|-----------------------------|------|
| AGRADECIMENTOS .....        | III  |
| RESUMO .....                | V    |
| ABSTRAT .....               | VII  |
| ÍNDICE GERAL .....          | IX   |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....     | XI   |
| LISTA DE ABREVIATURAS ..... | XIII |

## I. INTRODUÇÃO .....

1

|  |    |
|--|----|
| 1.1. A síntese proteica e o processo de <i>folding</i> .....                 | 1  |
| 1.1.1. <i>Folding</i> proteico: aspectos fundamentais .....                  | 1  |
| 1.1.2. Chaperões moleculares: <i>folding in vivo</i> .....                   | 4  |
| 1.2. Patologias resultantes de defeitos no <i>folding</i> proteico .....     | 7  |
| 1.3. A via metabólica de oxidação de ácidos gordos como caso de estudo ..... | 10 |
| 1.3.1. Deficiência da acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCADD) .....   | 13 |
| 1.3.2. Deficiência da acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCADD) .....   | 14 |
| 1.3.3. Deficiência da glutaril-CoA desidrogenase .....                       | 15 |
| 1.3.4. Deficiência múltipla das acil-CoA desidrogenases (MADD) .....         | 15 |
| 1.4. Métodos biofísicos para monitorização do <i>folding</i> proteico .....  | 18 |
| 1.4.1. Espectroscopia de fluorescência .....                                 | 19 |
| 1.4.2. Espectroscopia de Dicroísmo Circular .....                            | 19 |
| 1.4.3. Varrimento diferencial de fluorescência (DSF) .....                   | 20 |
| 1.5. Objectivo do trabalho .....   | 21 |

## II. MATERIAIS E MÉTODOS .....

23

|  |    |
|--|----|
| 2.1. Expressão e purificação proteica .....                  | 23 |
| 2.1.1. Expressão e purificação das ACDH .....                | 23 |
| 2.1.2. Expressão e purificação da ETF .....                  | 23 |
| 2.2. Ensaio bioquímicos e enzimáticos .....                  | 24 |
| 2.3. Espectroscopia de dicroísmo circular .....              | 24 |
| 2.4. Varrimento diferencial de fluorescência .....           | 25 |
| 2.5. Estudos funcionais em condições de stress térmico ..... | 25 |
| 2.6. Ensaio de partição pela chaperonina GroEL .....         | 25 |
| 2.7. Espectroscopia de fluorescência .....                   | 26 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>27</b> |
| <b>3.1. Recuperação de defeitos no <i>folding</i> proteico por pequenos chaperões farmacológicos .....</b>    | <b>27</b> |
| <b>3.1.1. Efeito dos substratos na estabilidade das ACDH em condições fisiológicas ..</b>                     | <b>27</b> |
| <b>3.1.2. Efeito do cofactor FAD, mas não do seu precursor riboflavina na estabilização das ACDH .....</b>    | <b>29</b> |
| <b>3.1.3. Combinação da estabilização do cofactor e dos substratos é aditiva .....</b>                        | <b>30</b> |
| <b>3.1.4. Os cofactores e metabolitos previnem a perda de actividade durante stress térmico moderado.....</b> | <b>31</b> |
| <b>3.2. Recuperação de defeitos no <i>folding</i> proteico por chaperões moleculares .....</b>                | <b>33</b> |
| <b>3.2.1. Efeito da GroEL no <i>folding</i> da ETFβ-p.D128N .....</b>   | <b>33</b> |
| <b>3.2.2. FAD previne a precipitação da ETFβ-p.D128N.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>3.2.3. Efeito da combinação da GroEL e do FAD no <i>folding</i> da ETFβ-D128N .....</b>                    | <b>36</b> |
| <b>3.2.4. Partição da ETFβ-p.D128N na ausência de FAD (?) .....</b>   | <b>37</b> |
| <b>3.2.5. Efeito do FAD na estabilidade térmica da ETFβ-p.D128 .....</b>                                      | <b>39</b> |
| <b>3.2.6. Efeito de pequenas moléculas na estabilidade térmica e partição da ETFβ-p.D128N.....</b>            | <b>40</b> |
| <b>IV. CONCLUSÃO .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>ANEXO 1 – tabelas referentes aos resultados .....</b>  | <b>53</b> |
| <b>ANEXO 2 - artigo.....</b>  | <b>61</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| 1.1. Representação dos funis do <i>folding</i> proteico .....   | 2  |
| 1.2. Representação do empacotamento molecular em <i>Escherichia coli</i> . ....   | 3  |
| 1.3. Modelos de <i>folding</i> citosólico de proteínas recém sintetizadas assistido por chaperões moleculares para os diferentes domínios da vida.....  | 5  |
| 1.4. Chaperonina GroEL-GroES.....   | 5  |
| 1.5. Modelo do mecanismo de acção da chaperonina GroEL-GroES que resume as alterações conformacionais na proteína substrato após transferência a partir da DnaK/DnaJ (sistema Hsp70) para a GroEL, e durante o <i>folding</i> mediado pela GroEL-GroES..... | 7  |
| 1.6. Possíveis destinos das proteínas com defeitos no <i>folding</i> . ....   | 8  |
| 1.7. Representação esquemática da via da $\beta$ -oxidação mitocondrial de ácidos gordos .....  | 12 |
| 1.8. Representação da estrutura da MCAD humana .....  | 14 |
| 1.9. Representação da estrutura da ETF humana. ....   | 16 |
| 1.10. Representação da estrutura da ETF-QO de porco.....  | 17 |
| 1.11. Representação da curva de desnaturação hipotética .....   | 18 |
| 3.1. Dependência da concentração de substrato na estabilidade térmica das ACDH .....  | 28 |
| 3.2. Curvas de desnaturação térmica.....  | 28 |
| 3.3. Efeito do FAD e riboflavina na estabilidade térmica das ACDH. ....   | 30 |
| 3.4. Efeito combinatório do FAD e dos metabolitos na estabilidade da SCAD .....   | 31 |
| 3.5. Recuperação da actividade das ACDH em condições de stress térmico pelos substratos e FAD.....  | 32 |
| 3.6. Efeito da GroEL na ETF quando submetida a uma temperatura moderada de 35°C. ....   | 35 |
| 3.7. Efeito do FAD na ETF $\beta$ -p.D128N quando submetida a uma temperatura moderada de 35°C.....   | 36 |
| 3.8. Efeito da GroEL na ETF $\beta$ -p.D128N quando submetida a uma moderada temperatura de 35°C na presença de FAD .....   | 37 |
| 3.9. Efeito da GroEL na ETF $\beta$ -p.D128N quando submetida a uma temperatura moderada de 35°C determinado por espectrofotometria de fluorescência.....   | 38 |
| 3.10. Efeito da GroEL na ETF $\beta$ -p.D128N durante o stress térmico na presença e ausência de FAD.....   | 39 |
| 3.11. Curvas de desnaturação térmica determinadas por DSF.....  | 40 |
| 3.12. Efeito dos osmólitos TMAO e sarcosina na partição da ETF $\beta$ -p.D128N na GroEL quando submetido a uma temperatura moderada de 37°C .....  | 41 |



## LISTA DE ABREVIATURAS

|                |   |
|----------------|---|
| 4-PBA          | 4-fenilbutirato   |
| ACDH           | Acil-CoA desidrogenases   |
| AEW            | Comprimento de emissão médio (do inglês <i>average emission wavelength</i> )                                    |
| AMP            | Adenisona monofosfato   |
| ANS            | Ácido 8-anilinaftaleno-1-sulfónico  |
| Asn            | Asparagina  |
| Asp            | Aspartato   |
| ATP            | Adenosina trifosfato  |
| CD             | Dicroísmo circular (do inglês <i>Circular Dichroism</i> )   |
| C <sub>m</sub> | Concentração de desnaturação química  |
| DNA            | Ácido desoxirribonucleico   |
| DSF            | Varrimento diferencial de fluorescência (do inglês <i>differential scanning fluorimetry</i> )                   |
| ETF            | Flavoproteína de transferência electrónica  |
| ETF-QO         | Flavoproteína de transferência electrónica-ubiquinona oxidoredutase   |
| FAD            | Dinucleótido flavina adenina  |
| FAO            | Oxidação dos ácidos gordos (do inglês <i>fatty acid oxidation</i> )   |
| FMN            | Flavina mononucleótido  |
| GCD            | Glutaril-CoA desidrogenase  |
| Hsp            | Proteína de choque térmico (do inglês <i>heat shock protein</i> )   |
| MADD           | Deficiência múltipla das acil-CoA desidrogenases (do inglês <i>multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency</i> ) |
| MCAD           | Acil-CoA desidrogenase de cadeia média (do inglês <i>medium chain acyl-CoA dehydrogenase</i> )                  |
| N              | Estado nativo   |
| NaCl           | Cloreto de sódio  |
| NADH           | Dinucleótido nicotinamida adenina   |
| Phe            | Fenilalanina  |
| SCAD           | Acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (do inglês <i>short chain acyl-CoA dehydrogenase</i> )                   |
| SDS-PAGE       | Electroforese em gel de poliácridamida na presença de dodecil sulfato de sódio                                  |

|                |                                     |
|----------------|-------------------------------------|
| T <sub>m</sub> | Temperatura de desnaturação térmica |
| TMAO           | Trimetilamina N-óxido               |
| Trp            | Triptofano                          |
| Tyr            | Tirosina                            |
| UV             | Ultravioleta                        |
| Vis            | Espectroscopia visível              |



## I. INTRODUÇÃO

A introdução desta dissertação encontra-se organizada em cinco secções. Na secção 1.1 descreve-se a síntese proteica e o processo de *folding*, abordando-se os aspectos fundamentais do *folding* proteico e especificando-se o papel dos chaperões moleculares neste processo *in vivo*. Apesar do esforço destes e de toda a maquinaria do sistema de controlo de qualidade das proteínas, o *folding in vivo* está longe de ser perfeito e podem ocorrer defeitos no *folding* que conduzem a estados patológicos. Na secção 1.2 apresentam-se essas patologias e possíveis estratégias de tratamento. Na secção 1.3 é apresentada a via metabólica da oxidação de ácidos gordos como caso de estudo. Aqui são abordados os aspectos gerais da oxidação dos ácidos gordos, especificando-se quatro tipos de doença. Na secção 1.4 descrevem-se alguns métodos biofísicos que permitem estudar e monitorizar o *folding* proteico. Por fim são apresentados os objectivos deste trabalho (secção 1.5).

### 1.1. A síntese proteica e o processo de *folding*

#### 1.1.1. *Folding proteico: aspectos fundamentais*

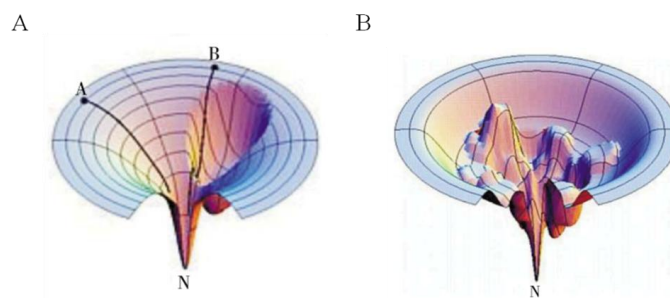
As proteínas são não só as macromoléculas biológicas mais abundantes, mas também as mais complexas em termos conformacionais e biologicamente versáteis [1]. São sintetizadas como sequências lineares de aminoácidos a partir da informação contida no genoma nuclear, ou a partir do DNA mitocondrial no caso das 13 proteínas mitocondriais da cadeia respiratória. Após sintetizadas necessitam de adquirir uma estrutura tridimensional específica, da qual depende directamente a sua função, por um processo designado de *folding* proteico [1-4]. Alguns dos autores traduzem este processo para português por “enrolamento”, mas neste trabalho optou-se por manter a designação anglo-saxónica.

O processo de *folding* proteico tem sido um assunto intensamente estudado desde os trabalhos pioneiros de Anfinsen e seus colaboradores acerca do *folding/unfolding* da ribonuclease A [5]. Estes mostraram que uma cadeia polipeptídica pode adquirir o *folding* espontaneamente *in vitro* sem requerer a assistência de nenhum factor celular [5], provando que toda a informação necessária para uma proteína adquirir a sua conformação nativa se encontra codificada na sua sequência linear de aminoácidos. Mostraram também que o processo de *folding* das proteínas se baseia estritamente na termodinâmica, ou seja, na procura aleatória de uma conformação única termodinamicamente mais estável para a qual a energia livre de Gibbs seja mínima [1, 2, 5, 6]. Todavia, Levinthal focando-se na cinética e dinâmica do *folding*, mostrou que o processo de *folding* não consiste na

exploração de todas as conformações possíveis, mas sim ocorre através de uma via bem definida e sequencial. Caso contrário, até mesmo uma proteína pequena ( $\sim 100$  aminoácidos) necessitaria de um tempo biologicamente irrealista ( $\sim 10^{29}$  anos) para adquirir a sua estrutura nativa [7].

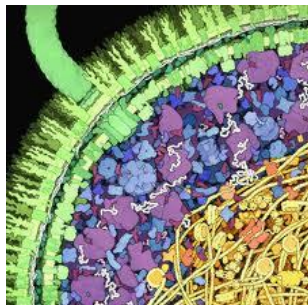
Na tentativa de se explicar o facto de as proteínas adquirirem a sua conformação nativa numa escala temporal de milissegundos, o *folding* proteico tem sido representado através de um funil de energia (figura 1.1) [3]. Este funil de energia tem sido usado para ilustrar que o grande número de conformações acessíveis para uma proteína (superfície do funil) se torna progressivamente mais restrito à medida que as interações nativas aumentam [4, 8], terminando por fim numa estrutura nativa para a qual a energia livre é mínima (fundo do funil). Por oposição ao estado nativo, os estados *unfolding* são caracterizados por um alto grau de entropia conformacional e por uma alta energia livre de Gibbs (superfície do funil) [8, 9]. Este alto grau de entropia deve-se à presença de um grande número de conformações possíveis para uma proteína, e a energia livre à instabilidade do estado *unfolding*.

O funil de *folding* pode ser liso ou apresentar rugosidades. O processo de *folding* de proteínas pequenas, as quais adquirem o *folding* numa escala de milissegundos, é normalmente ilustrado por um funil liso (figura 1.1A). Contudo, este pode também apresentar uma armadilha cinética, indicativa da presença de possíveis estados intermediários estáveis, que, no entanto, não conduzem a uma óptima termodinâmica global. A figura 1.1B ilustra um funil rugoso característico do *folding* de proteínas grandes que apresentam muitas barreiras energéticas, as quais podem levar à formação de intermediários até se atingir a topologia final [2].



**Figura 1.1 – Representação dos funis do *folding* proteico.** Estes funis representam a paisagem de energia do processo de *folding* das proteínas *in vitro* até atingirem a conformação final. (A) Funil de *folding* característico de proteínas pequenas, as quais adquirem o *folding* espontaneamente. Percurso A, funil de *folding* liso representativo do *folding* que ocorre espontaneamente até se adquirir o estado nativo sem a presença de nenhuma barreira que leve à formação de intermediários. Percurso B, apresenta uma armadilha cinética, indicativa da presença de possíveis estados intermédios, mesmo para proteínas pequenas. (B) Ilustra um funil de *folding* rugoso com muitas armadilhas cinéticas, i.e. múltiplas barreiras energéticas que podem levar à formação de intermediários até se atingir a topologia final. Este tipo de funil é comum para proteínas grandes. Adaptado de [2].

*In vivo* o *folding* das proteínas ocorre num ambiente celular extremamente concentrado (300-400 mg/ml de proteínas e outras macromoléculas) (figura 1.2), enquanto que *in vitro* o *refold* de uma cadeia polipeptídica ocorre em soluções muito diluídas (<1 mg/ml).



**Figura 1.2 – Representação do empacotamento molecular em *Escherichia coli*.** Representação de David S. Goodsell, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA.

O facto de o *folding in vivo* ocorrer num ambiente extremamente sobrecarregado torna-o dependente de certos factores como o grau de confinamento da proteína e o efeito de crowding. Alguns dos autores traduzem este efeito para português por “efeito de empacotamento”, mas neste trabalho optou-se por manter a designação anglo-saxónica. O confinamento da proteína apresenta um efeito positivo resultando num aumento da estabilidade da proteína, devido a restringir o número de conformações expostas e favorecer os contactos nucleares. O efeito de crowding pode ter por um lado, um impacto positivo no processo de *folding* uma vez que ao promover a exclusão de volume estabelece os estados nativos e compactos [10, 11]. Por outro lado, pode ter um impacto negativo no processo de *folding* uma vez que ao promover a exclusão de volume pode alterar substancialmente a afinidade entre as macromoléculas e conduzir ao *misfolding* proteico e à agregação [1, 2, 4, 6]. Outro factor que pode adicionalmente aumentar o risco de *misfolding* e agregação é o processo de tradução. Isto pode acontecer especialmente em células eucarióticas devido às cadeias polipeptídicas serem em média de maiores dimensões, e a tradução ser mais lenta que nos procariontes. Resultando assim, na presença de cadeias nascentes com um *folding* parcial por prolongados períodos de tempo os quais são sensíveis à agregação [1, 6].

De forma a lidarem com os desafios do processo de *folding*, os sistemas biológicos desenvolveram uma maquinaria proteica específica - o sistema de controlo de qualidade proteica. Este compreende os chaperões moleculares, proteases e factores reguladores que regulam a actividade ou permitem a comunicação entre os vários componentes [3, 7]. Este sistema tem a capacidade de supervisionar o *folding*, contrariar a agregação e seleccionar e eliminar polipéptidos com baixa capacidade de *folding* ou com erros que poderiam exercer efeitos tóxicos para a célula [1, 4, 6]. Este sistema é também capaz de

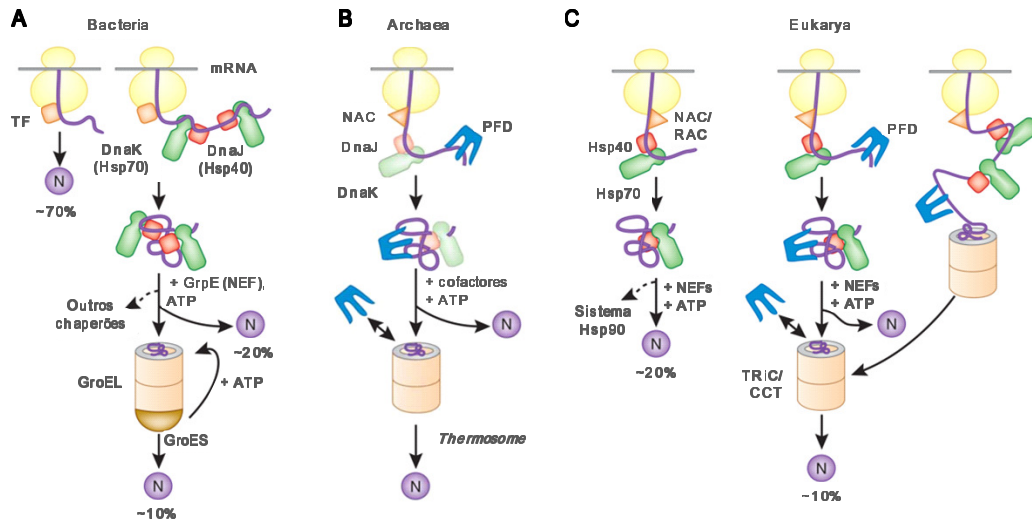
se adaptar a stress ambientais como alterações de pH, temperatura e stress oxidativo, os quais afectam fortemente o *folding* proteico [4].

### 1.1.2. Chaperões moleculares: *folding in vivo*

Os chaperões moleculares, como referido, fazem parte da maquinaria celular constituída por várias proteínas que supervisionam a qualidade do *folding* de proteínas sintetizadas. Estas proteínas são capazes de interagir, estabilizar, ou auxiliar proteínas a adquirir uma estrutura final correcta *in vivo*, mas que não determinam a estrutura funcional final [1, 4]. São conhecidos ainda como proteínas de choque térmico (Hsp – do inglês *heat shock proteins*), devido a serem sobre-expressas nas células em condições de stress conformacional. Contudo um número de chaperões pode ser constitutivamente expresso e fazer parte dos sistemas de expressão proteico em condições de não stress [4]. Estes chaperões são classificados de acordo com a sua massa molecular de: Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 e pequenas Hsps [1, 6].

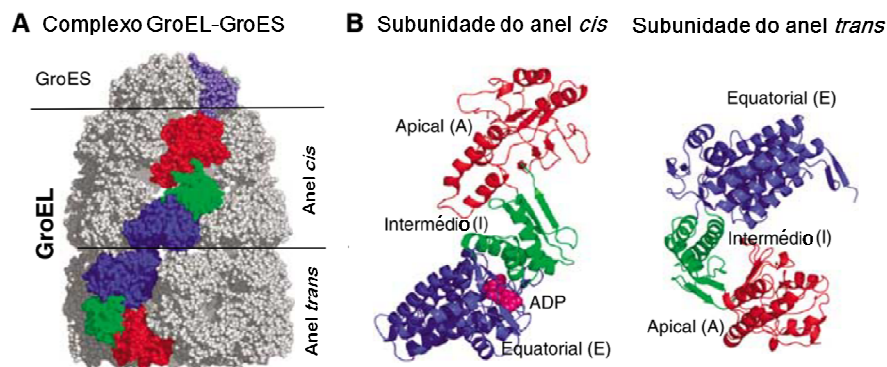
Os chaperões moleculares são altamente conservados, estando presentes nos três domínios da vida onde estão envolvidos em múltiplas funções celulares, incluindo o *folding de novo*, *refolding* de proteínas desnaturadas por stress, montagem oligomérica, transporte de proteínas intracelulares, e assistência na degradação proteolítica [1, 2, 6]. Nos três domínios da vida, uma fracção dos chaperões moleculares encontra-se associado ao ribossoma, actuando na estabilização de polipéptidos nascentes e iniciação do seu *folding*, e outra fracção auxilia o processo de *folding* até se atingir a topologia final (figura 1.3) [1, 6]. Especificamente, os chaperões assistem o *folding* a quatro níveis: (1) Previnem o *folding* prematuro das cadeias polipeptídicas nascentes ao nível dos ribossomas (exemplo do factor Trigger (TF) nas bactérias (figura 1.3A); sistema especializado Hsp70, denominado RAC (do inglês - *ribosome-associated complex*), nos eucariontes (figura 1.3C); e o complexo NAC (do inglês - *nascent chain-associated complex*) também presente em Archaea (figura 1.3B)) [1, 2, 6, 12-14]; (2) Auxiliam as cadeias polipeptídicas a adquirirem a estrutura tridimensional, por exemplo a família das Hsp70 eucariontes (DnaK nas bactérias); (3) Permitem que a cadeia polipeptídica, após de libertada pelo ribossoma, efectue o *folding* e/ou o *refolding* num ambiente protector dentro de uma “gaiola” molecular, tais como a GroEL/GroES (nas bactérias) (figura 1.3B) e TRiC/CCT (nos eucariontes) (figura 1.3C), as quais são designadas de chaperoninas (e serão descritas em detalhe nos parágrafos seguintes devido a serem uma ferramenta deste trabalho) [2]; (4) E promovem o *unfold* de uma proteína *misfolded* e/ou

agregada, como os membros da família HSP100/CIP [2]. O seu mecanismo de acção é dependente da hidrólise de ATP (adenosina trifosfato) e o *folding* é promovido por ciclos de ligação/libertação da proteína substrato.



**Figura 1.3 - Modelos de *folding* citosólico de proteínas recém sintetizadas assistido por chaperões moleculares para os diferentes domínios da vida.** (A) Bacteria. TF, factor trigger; N, proteína nativa. (B) Archaea. PFD, *prefoldin*; NAC, complexo associado a cadeias nascentes (do inglês - *nascent chain-associated complex*). (C) Eukarya. RAC, complexo associado ao ribossoma (do inglês - *ribosome-associated complex*). Adaptado de [6].

As chaperoninas, também descritas como “gaiola” de *folding*, são estruturas em forma de barril de ~800 kDa constituídas por dois anéis e uma cavidade interna na qual as proteínas substrato são totalmente encapsuladas e podem adquirir o *folding* num ambiente imperturbado (figura 1.4) [4, 14, 15].

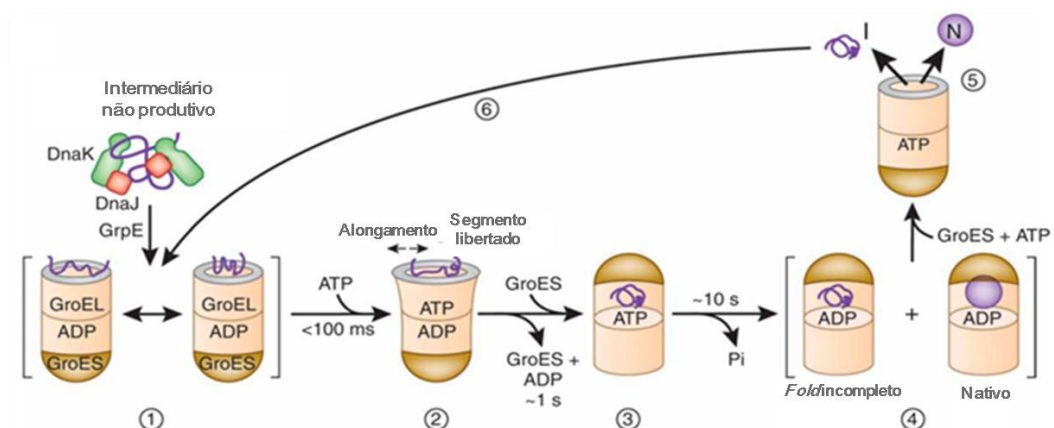


**Figura 1.4 - Chaperonina GroEL-GroES.** (A) Estrutura cristalográfica do complexo GroEL-GroES (PDB 1AON), mostrando a GroES ligada à GroEL no anel *cis*, o anel oposto (*trans*) e uma das sete subunidades por anel. (B) e (C) mostram diagramas de duas subunidades pertencentes, respectivamente, aos anéis *cis* e *trans*. Cada subunidade é composta por três domínios, A, I e E, que se referem respectivamente, ao domínio apical, intermédio e equatorial. A cor-de-rosa no anel *cis* é também mostrada uma molécula de ADP ligada ao domínio equatorial ATPase. Adaptado de [16].

As chaperoninas dividem-se em dois grupos. O grupo I, também designadas de Hsp60, encontra-se presente em bactérias (GroEL), mitocôndrias (Hsp60) e cloroplastos (Cpn60) [1, 6, 15]. Estas possuem sete subunidades de ~60 kDa por anel e consistem em três domínios (figura 1.4) [17]: o domínio equatorial ATPase (figura 1.4 a azul), situado no meio do barril, e o qual forma os principais contactos inter-subunidades; um domínio apical (figura 1.4 a vermelho), situado em ambas as extremidades do barril, e que expõe resíduos aminoácidos hidrofóbicos para ligação do substrato em direcção ao centro do anel; e um domínio intermédio (figura 1.4 a verde) que conecta o domínio equatorial com o domínio apical [1, 6, 15-18]. Estas chaperoninas funcionam em cooperação com as proteínas Hsp10 (GroES nas bactérias), as quais funcionam como uma tampa da “gaiola” de *folding* no encapsulamento das proteínas (figura 1.4A) e é constituída por um único anel homo-heptamérico composto por subunidades de ~10 kDa [1, 6, 15]. O grupo II encontra-se presente no reino Archaea (*thermosome*) e no citosol das células eucariotas (TRiC/CCT), e são constituídas por oito ou nove subunidades por anel [15]. Este grupo é estruturalmente semelhante à GroEL, contudo diferencia-se desta através do seu domínio apical (figura 1.4B), o qual possui uma extensão especializada da hélice- $\alpha$  que actua como uma tampa interna e substitui a função da GroES, sendo assim independentes de factores Hsp10 [1, 6]. O mecanismo de acção das chaperoninas do tipo II ainda não se encontra compreendido.

O mecanismo de acção das chaperoninas do tipo I é idêntico ao mecanismo dos chaperões moleculares, sendo dependente da hidrólise de ATP e o *folding* promovido por ciclos de ligação/libertação da proteína substrato. A diferença reside no facto de que o *folding* pelas chaperoninas ocorre por encapsulamento global da proteína pela Hsp10. O mecanismo de *folding* por parte da chaperonina GroEL é dependente do encapsulamento global das proteínas substrato pela GroES. As proteínas substratos não nativas ligam-se através de interacções hidrofóbicas ao domínio apical do anel desocupado; depois a GroES e o ATP ligam-se ao anel, conduzindo a uma dramática alteração conformacional do sistema que leva à formação de uma “gaiola” com um ambiente interno altamente hidrofílico e carregado negativamente onde a proteína é encapsulada. As proteínas de tamanho até ~60 kDa podem ser encapsuladas neste ambiente, onde adquirem o *folding* espontaneamente em 10-15 segundos, o tempo necessário para a hidrólise do ATP no anel de ligação da GroES (anel *cis*). As proteínas substrato são depois libertadas da “gaiola” de *folding* quando ocorre a dissociação da GroES induzida pela ligação de ATP no anel oposto (anel *trans*) [1, 6, 15]. Os substratos que não adquirirem o *folding* correcto re-ligam-se rapidamente à GroEL para uma etapa adicional de *folding* (figura 1.5). As

proteínas que excedem o tamanho limite da “gaiola” da chaperonina (~60 kDa) usam o sistema Hsp70, ou podem atingir o estado nativo através da associação e dissociação com a GroEL sem ocorrer encapsulamento [19]. O encapsulamento das proteínas *unfolded* é feito para apenas uma molécula de proteína de cada vez, de forma a prevenir a agregação durante o *folding* [1, 6].



**Figura 1.5 - Modelo do mecanismo de acção da chaperonina GroEL-GroES que resume as alterações conformacionais na proteína substrato após transferência a partir da DnaK/DnaJ (sistema Hsp70) para a GroEL, e durante o *folding* mediado pela GroEL-GroES.** (1) A proteína substrato pode ser entregue à GroEL pela DnaK/DnaJ numa forma não agregada, mas como um intermediário não produtivo. (2) O movimento do domínio apical da GroEL, é dependente de ATP, e resulta num alongamento das regiões fortemente ligadas da proteína substrato e na libertação e compactação parcial de regiões ligadas menos estáveis. (3) A compactação está completa após o encapsulamento da proteína substrato pela GroES. (4) Ocorre o *folding* na “gaiola” da chaperonina. (5) Libertação do substrato após a dissociação da GroES. (6) Re-ligação de estados com um *fold* incompleto. N, estado nativo; I, intermediário de *folding*. Adaptado de [6].

## 1.2. Patologias resultantes de defeitos no *folding* proteico

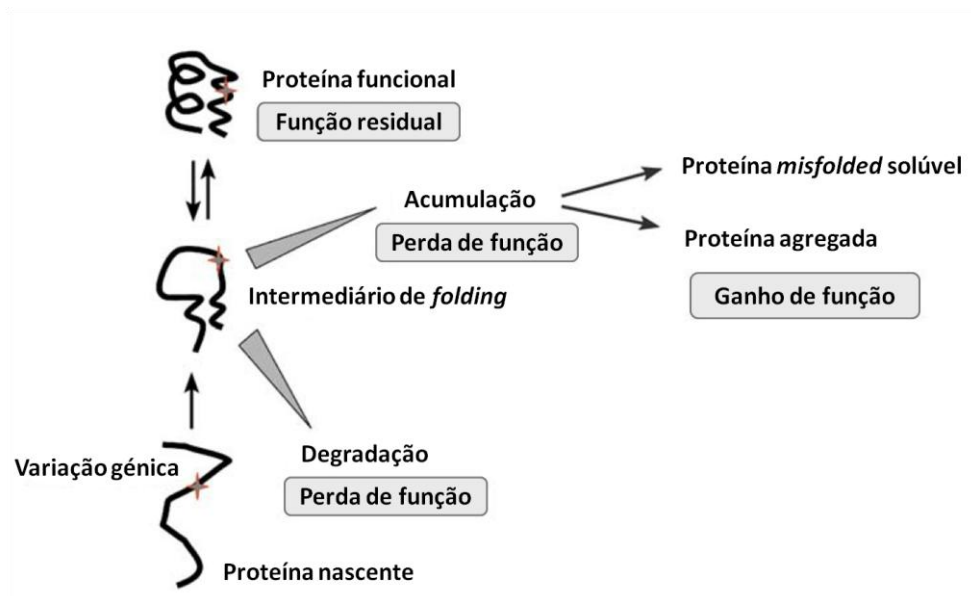
Apesar do *folding in vivo* ser auxiliado por chaperões moleculares, este continua a estar longe de ser perfeito. Cerca de 20% das proteínas recém sintetizadas são incapazes de atingir o *fold* correcto, mesmo com o auxílio dos chaperões moleculares, e acabam por ser degradadas pelas proteases [20]. Apesar do esforço destes componentes do sistema de controlo de qualidade, por vezes ocorrem falhas e começam a observar-se comportamentos patológicos associados com o *misfolding* proteico. Alterações no ambiente celular, tais como flutuações de temperatura, aumento do stress oxidativo e envelhecimento, bem como alterações no nível proteico, como mutações *missense*, têm aumentam o *misfolding* proteico conduzindo à falha do sistema de controlo de qualidade das proteínas [21].



Nos casos de *misfolding* proteico existem moléculas capazes de promover o *folding* correcto das proteínas que não atingem a estrutura tridimensional correcta, permitindo-lhes serem parcialmente funcionais, enquanto as restantes são capturadas como conformações *unfold* podendo ser acumuladas ou degradadas. O acumular ou a degradação das proteínas *unfold* vai depender da natureza da proteína e da variação genética, e de outros factores genéticos (interacções gene-gene), bem como condições celulares e ambientais, e factores de stress (interacções gene-ambiente) [22].

Dependendo da deficiência da proteína e das interacções ambientais, as proteínas não nativas podem agrupar-se e vir a perturbar a função celular normal, ou podem interagir com os chaperões moleculares acabando por influenciar o processo de *folding* de outras proteínas [22].

Na figura 1.6 encontram-se possíveis destinos das proteínas com defeitos no *folding*.



**Figura 1.6 - Possíveis destinos das proteínas com defeitos no *folding*.** Adaptado de [22].

O *misfolding* proteico e a agregação podem resultar num largo e diverso grupo de doenças descritas como doenças conformacionais e de *misfolding* proteico [21]. Estas patologias podem resultar quer em ganho, quer na perda de função. Entre as patologias associadas ao ganho de função encontram-se as doenças amilóides e de Huntington [23]. Entre as patologias associadas à perda de função encontram-se a fibrose quística, fenilketonúria, e SCADD (deficiência da acil-CoA desidrogenase de cadeia curta) que afectam, respectivamente, o retículo endoplasmático, citosol e mitocôndria [4]. A



SCADD é uma das doenças metabólicas da oxidação dos ácidos gordos, usada como modelo no presente trabalho juntamente com outras da mesma via, para o estudo de *folding* e efeito de chaperões químicos e moleculares no processo de *folding* na tentativa de recuperação desses defeitos.

Cerca de 30-50% das doenças conformacionais devem-se a defeitos no *folding* proteico. Na tentativa de se reverterem esses defeitos têm sido propostas abordagens mais direccionadas para o alvo e que oferecem a possibilidade de se desenvolverem terapias farmacológicas mais específicas [24].

Uma das estratégias interessantes e potencial terapia para minimizar as doenças de *folding* proteico envolvidas em doenças conformacionais, baseia-se na identificação de compostos de baixa massa molecular [24-26]. Existe uma diversidade de moléculas capazes de exercer efeito sobre o *folding* de proteínas [27]. Alguns autores agrupam estas moléculas em chaperões químicos ou chaperões farmacológicos. A distinção entre estes dois grupos reside no mecanismo de acção, que é inespecífico para os chaperões químicos e específico para os farmacológicos [27].

Os chaperões químicos compreendem principalmente osmólitos e estabilizadores proteicos incluindo açúcares (ex. trealose), polióis (ex. glicerol e sorbitol), aminoácidos e seus derivados (ex. sarcosina e glicina), metilaminas (ex. trimetilamina N-óxido) e compostos hidrofóbicos (ex. 4-PBA). Muitos destes compostos são sintetizados ou absorvidos pelos organismos vivos, como microrganismos, plantas e animais, de forma a minimizar a desnaturação proteica como resultado da adaptação a condições ambientais ou de stress. Estas moléculas são frequentemente referidas como solutos compatíveis, podendo serem acumuladas dentro da célula sem afectar a função de outras macromoléculas [27]. O mecanismo de acção destes compostos é inespecífico, uma vez que não se ligam directamente às proteínas. A sua acção resulta do efeito de hidratação, o qual resulta da capacidade das moléculas de água para estabelecerem interações favoráveis com os grupos polares do *backbone* da proteína, conduzindo, desta forma, à compactação desta [27]. Para além de promoverem a compactação da proteína pelo efeito de hidratação, a presença dos osmólitos pode também resultar num aumento da densidade do solvente, que torna restrito o movimento livre das proteínas, e conduz ao aumento da sua compactação [28, 29]. O mecanismo inespecífico dos chaperões químicos permite-lhes intervir em diferentes estados do processo de *folding*, podendo estabilizar o estado nativo, prevenir a agregação e degradação, e promover o *refolding* de proteínas *misfolded* destabilizadas [30]. Aparte desta acção directa na reacção de *folding*, certos químicos

podem também regular chaperões moleculares e o sistema de resposta a proteínas *unfolded* [31].

Os chaperões farmacológicos têm uma acção específica na proteína alvo. É um grupo mais heterogéneo uma vez que compreende moléculas que estabelecem ligações fracas com a proteína alvo como inibidores competitivos, ligandos, agonistas/antagonistas e cofactores proteicos tais como metais e flavinas. Estes compostos têm baixa massa molecular e ligam-se reversivelmente a uma proteína específica sendo capazes de restabelecer a sua função e promover o seu *folding* [27].

Esta estratégia tem sido explorada para muitas doenças tais como a fibrose quística [32], fenilcetonúria [33], Huntington [34] e a doença de Gaucher [35].

Outra estratégia usada para minimizar as doenças de *folding* proteico tem sido o uso do sistema chaperonina GroEL-GroES, visto este ter a capacidade de se ligar a diferentes estados transitórios de *folding* e ao facto de a GroEL ser uma proteína altamente estável ( $T_m \sim 70^\circ\text{C}$ ) e funcionar em diferentes condições tais como na presença de baixas concentrações de desnaturantes como 1M de ureia, condições de crowding proteico e numa ampla gama de pH, e funcionar também quer na forma solúvel como imobilizada num suporte sólido [24, 36]. O emprego da chaperonina GroEL imobilizada em esferas como um nanoreactor biológico capaz de discriminar entre conformações no estado nativo, misfolding e agregados, é um desenvolvimento tecnológico muito recente, o qual tem aberto a possibilidade do desenvolvimento de estratégias específicas na recuperação *in vitro* de proteínas *misfolded* e agregadas. Este sistema tem sido também usado no *screen* de pequenas moléculas capazes de recuperar o misfolding proteico e a agregação (os tão designados sistemas chaperonina/osmólito).

### 1.3. A via metabólica de oxidação de ácidos gordos como caso de estudo

Doenças da via metabólica de ácidos gordos encontram-se entre as patologias causadas por defeitos no *folding* proteico. De forma a enquadrar os quatro tipos de doenças usados como caso de estudo neste trabalho, apresentam-se nesta secção os aspectos gerais da via metabólica da oxidação de ácidos gordos, especificando-se depois cada um dos tipos de doença.

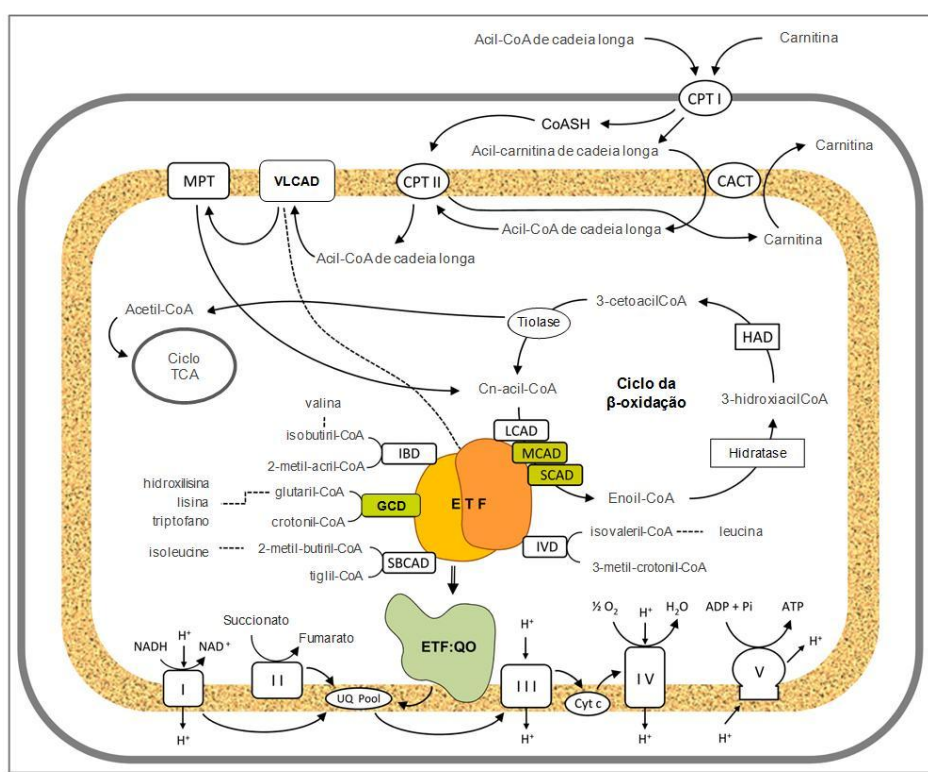
A oxidação dos ácidos gordos (FAO – do inglês *Fatty acid oxidation*) representa um importante recurso de energia para o organismo durante períodos de jejum, febre, exercício físico intenso e stress metabólico quando o suplemento de glucose é limitado [37, 38]; fornecendo substratos de carbono para a gluconeogénese e contribuindo com electrões para a cadeia respiratória para produção de energia [38, 39]. Sob estas

condições, o fígado converte os ácidos gordos em acetil-CoAs, os quais suportam a gluconeogénese; e em corpos cetónicos, os quais são libertados na circulação e fornecem energia aos tecidos que não são capazes de oxidar os ácidos gordos tais como o cérebro [38-40]. Os outros tecidos, como o músculo cardíaco e esquelético e rim são capazes de oxidar os ácidos gordos canalizando acetil-CoA para o ciclo de Krebs para produção de energia [38, 40].

Os ácidos gordos (FAs – do inglês *fatty acids*) são compostos constituídos por um grupo carboxílico e uma cadeia longa (de pelo menos 8 átomos de carbono) alifática linear ou ramificada, bem como saturada ou mono- ou polisaturada [41]. A maioria dos FAs naturais contém um número par de carbonos devido a serem sintetizados a partir de acetil-CoA [41]. Os FAs não se encontram livres na célula, sendo armazenados como componentes de fosfolípidos ou de triglicerídeos sendo estes últimos a principal fonte de ácidos gordos [39].

Os ácidos gordos podem ser metabolizados na célula através de três vias diferentes, designados de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, e  $\omega$ -oxidação, as quais têm lugar em estruturas celulares especializadas tais como as mitocôndrias e os peroxisomas [41]. As mitocôndrias são predominantemente responsáveis pela oxidação dos ácidos gordos de 20 carbonos ou menos, enquanto os peroxisomas são mais relevantes na oxidação de ácidos gordos de cadeia longa [38]. A via de oxidação mais bem caracterizada é a da  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos (figura 1.7) [40], a qual tem lugar na matriz mitocondrial [41]. Esta via inicia-se com a activação dos ácidos gordos de cadeia longa no citosol, numa acilação dependente de ATP, que dá origem aos acil-CoAs [22, 41]. Posteriormente, os ácidos gordos de cadeia longa e muito longa atravessam a membrana interna da mitocôndria como derivados de carnitina através de três proteínas, as quais constituem o “shuttle carnitina” - a carnitina palmitoil transferase I (CPT I); a acil-carnitina translocase (CAT) e a carnitina palmitoil transferase II (CPT II) (figura 1.7) [22, 39, 41]. Os ácidos gordos de cadeia média e curta entram directamente na matriz mitocondrial sem necessitarem de ser activados [41]. Uma vez na matriz mitocondrial, os ácidos gordos acil-CoA sofrem desidrogenação pelas flavoenzimas acil-CoAs desidrogenases com diferentes especificidades de acordo com o tamanho da cadeia. Todas estas enzimas localizam-se na matriz, com a excepção da acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa (VLCAD) associada à membrana interna e com alta afinidade para ácidos gordos acil-CoA de C12-C24 (figura 1.7). As subsequentes 3 etapas são catalisadas, respectivamente, pela enoil-CoA hidratase, 3-l-hidroxiacil-coa desidrogenase e  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolase, e conduzem à formação do acetil-CoA e ácidos gordos de dois carbonos [22, 42] (figura 1.7). Os ácidos

gordos insaturados seguem um percurso semelhante até a configuração *cis* de ligação dupla impedir a formação de um substrato para a acil-CoA desidrogenase e enoil-CoA hidratase [22, 41]. Neste ponto, enzimas adicionais são requeridas como a  $\Delta^3, \Delta^2$  transenoi-CoA isomerase ou a 2,4-dienoil-CoA reductase 1, caso a ligação insaturada se localize respectivamente, num carbono ímpar ou carbono par [22, 41]. Os ácidos gordos com um número ímpar de carbonos são degradados na mesma via, mas o produto final, propionil-CoA (3C) é depois convertido em succinil-CoA para entrar no ciclo do ácido cítrico [22, 41].



**Figura 1.7 – Representação esquemática da via da  $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos.** Ver em detalhe no texto. Adaptado de [43].

A família das acil-CoA desidrogenases (ACDH) compreende, nos humanos 11, proteínas mitocondriais envolvidas na oxidação dos ácidos gordos e no metabolismo dos aminoácidos incluindo, respectivamente, a acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCAD), de cadeia média (MCAD), de cadeia longa (LCAD) e de cadeia muito longa (VLCAD), a ACAD9, a ACAD10 e a ACAD11; e a isovaleril-CoA desidrogenase (IVD), as acil-CoA desidrogenases de cadeia curta e ramificada (SBCAD), a isobutiril-CoA desidrogenase (IBDH) e a glutaril-CoA desidrogenase (GCD). Todas estas acil-CoA desidrogenases partilham uma sequência e estrutura nativa com elevado grau de

homologia, possuindo duas ou quatro subunidades formando, respectivamente, homodímeros ou homotetrameros e possuem um grupo prostético FAD (dinucleótido flavina adenina) não covalentemente ligado por subunidade. Apesar destas semelhanças, as ACDH diferem na especificidade para os seus substratos [44, 45]. Esta família de ACDH é responsável pela catalisação da  $\beta$ -desidrogenação dos ésteres acil-CoA por transferência de electrões para uma flavoproteína de transferência electrónica (ETF), uma enzima chave nesta via da  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos, que posteriormente os canaliza para a cadeia respiratória via ETF-ubiquinona oxidoredutase (ETF-QO) levando à consequente produção de ATP [45-47].

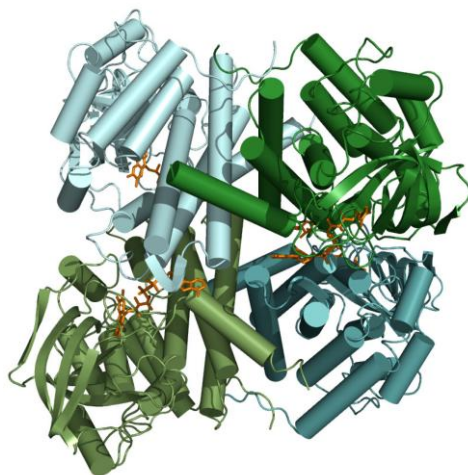
Defeitos genéticos nas acil-CoA desidrogenases mitocondriais e na ETF e ETF-QO estão entre as doenças metabólicas mais comuns. Por exemplo, a deficiência da MCAD é a doença mais frequente deste grupo com uma frequência de 1:15000 em populações caucasianas [48, 49]. Estas doenças conformacionais estão associadas a defeitos genéticos, e dependendo da especificidade desse defeito, os pacientes sofrem de hipoglicémia hipocetónica durante o jejum, cardiomiopatia, disfunção do fígado, ou de morte súbita [39]. Os fenótipos clínicos têm-se expandindo consideravelmente estando associados com um número crescente de entidades clínicas tais como o síndrome de Reye, síndrome da morte súbita infantil, síndrome de vômitos cíclicos e complicações maternas na gravidez [42]. As formas menos severas destas doenças resultam da diminuída estabilidade e actividade das enzimas devido a defeitos no seu *fold*. De modo a melhorar os conhecimentos destas doenças ao nível molecular, estudou-se o *folding* e o efeito de chaperões químicos e moleculares na estrutura de quatro destas enzimas usando-se como modelo duas proteínas envolvidas na  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos – MCAD e SCAD; uma proteína envolvida no metabolismo dos aminoácidos – GCD; e a proteína aceitadora dos electrões de todas as acil-CoA desidrogenases - ETF.

### **1.3.1. Deficiência da acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCADD)**

A deficiência na acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCADD; OMIM 201450) é de longe a doença mais frequente do grupo de doenças da família ACDH, com uma frequência de 1:15000 em populações caucasianas [48, 49].

A deficiência na acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD; EC 1.3.99.3) está associada, em geral, a mutações *missense* no gene nuclear *ACADM* que codifica uma proteína precursora de 47kDa que é importada para a mitocôndria, onde depois o péptido sinal N-terminal é clivado e a proteína adquire o *folding* assistido pelos chaperões Hsp70 e Hsp60, originando a proteína MCAD madura de 44kDa. A MCAD nativa é formada por

4 monómeros sendo cada um deles constituído por três domínios [50, 51]. Os domínios N- e C-terminal são principalmente constituídos por hélices- $\alpha$  empacotadas e o domínio do meio é formado por duas folhas- $\beta$  (figura 1.8). Como todas as ACDH possui um cofactor flavina por subunidade o qual se posiciona na fenda entre o domínio- $\beta$  e C-terminal de uma subunidade e o domínio C-terminal da subunidade vizinha [52].



**Figura 1.8 – Representação da estrutura da MCAD humana.** A estrutura da proteína encontra-se representada como um cartoon com hélices representadas por cilindros e folhas- $\beta$  representadas por setas, os cofactores estão representados como *sticks*, e cada subunidade está representada por uma cor diferente. A estrutura foi obtida usando o programa *Pymol* (PDB:1ege).

A MCAD é a enzima responsável pela  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos de cadeia média (6-12 carbonos). Quando deficiente apresenta um *fold* proteico comprometido e uma actividade enzimática diminuída, a qual resulta num decréscimo de produção de corpos cetónicos e num aumento do nível dos seus substratos [53, 54]. Uma diversidade de sintomas tem estado associado com esta doença variando desde hipoglicémia até coma e morte súbita [42].

### 1.3.2. Deficiência da acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCADD)

A deficiência na acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCADD; OMIM 201470) é uma doença rara, autossómica recessiva [22]. Está associada a alterações no respectivo gene – *ACADS* – localizado no cromossoma 12q22 que codifica um precursor citosólico da acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCAD; EC 1.3.8.1) que é transportado para a mitocôndria, onde o péptido sinal N-terminal é clivado proteoliticamente [55-57]. A enzima SCAD, na sua forma nativa, apresenta uma estrutura semelhante à MCAD (figura 1.8), sendo um homotetramero com massa molecular de 168 kDa e contém um grupo prostético FAD por subunidade [55, 58].

Esta proteína é a enzima da  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos de cadeia curta que catalisa a desidrogenação do butiril-CoA (C4-CoA) [59]. Este substrato C4-CoA pode ser convertido em diferentes metabolitos, especificamente, em ácido etilmalónico (EMA) o qual é característico da SCADD. Quando a sua actividade é comprometida, devido a erros, o substrato (C4-CoA) e seus derivados são acumulados no sangue, urina e nas células [55, 59].

Uma variedade de fenótipos tem sido atribuída à SCADD incluindo: insuficiência no crescimento, acidose metabólica, hipoglicémia, atraso no desenvolvimento, convulsões e sintomas neuromusculares tais como miopatia e hipotonia [55].

### ***1.3.3. Deficiência da glutaril-CoA desidrogenase***

A deficiência da glutaril-CoA desidrogenase, conhecida como a doença acidúria glutárica do tipo I (GA-I; OMIM 231670), é uma doença neurometabólica rara, autossómica recessiva, do metabolismo da lisina, hidroxilisina e triptofano [60-62]. Esta doença apresenta uma prevalência estimada de 1:100000 recém-nascidos [60].

A glutaril-CoA desidrogenase (GCD; EC 1.3.99.7) é codificada pelo gene *GCDH*, localizado no cromossoma humano 19p13.2, na forma de uma proteína precursora que é importada para a mitocôndria onde depois os resíduos N-terminal são clivados [61]. A GCD localiza-se na matriz mitocondrial na forma de homotetramero com estrutura similar à MCAD (figura 1.8) e é responsável pela conversão de glutaril-CoA em crotonil-CoA requerendo FAD como coenzima [61, 62]. Mais de 200 mutações no gene *GCDH* são conhecidas. Estas mutações estão associadas a uma reduzida actividade enzimática da GCD, resultando na acumulação de ácido hidroxiglutárico e glutárico nos tecidos e fluidos corporais dos pacientes afectados. Estes pacientes podem apresentar atrofia cerebral e macrocefalia [61, 62]. A doença pode ser atenuada pela administração de uma dieta com restrição de lisina e triptofano e suplementação de carnitina [61]. Quando a doença não é tratada pode resultar numa elevada mortalidade [60].

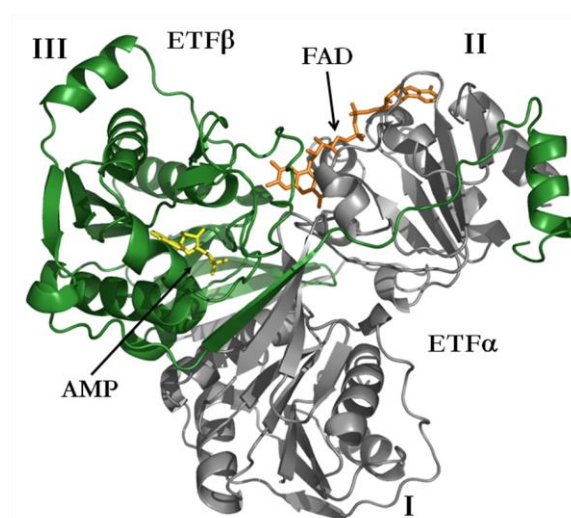
### ***1.3.4. Deficiência múltipla das acil-CoA desidrogenases (MADD)***

A deficiência múltipla das acil-CoA desidrogenases (MADD; OMIM 231680), também conhecida como acidúria glutárica do tipo II (GA II), é uma doença rara, hereditária autossómica recessiva associada ao metabolismo dos ácidos gordos, aminoácidos e colina [63-66]. Na maioria dos casos, resulta do comprometimento da transferência de electrões entre 11 flavoproteínas desidrogenases da matriz mitocondrial e a cadeia de transporte electrónico, devido a mutações nos genes que codificam a

subunidade  $\alpha$  (*ETFA*) e subunidade  $\beta$  (*ETFB*) da flavoproteína de transferência electrónica (ETF) ou no gene que codifica a sua desidrogenase (*ETFDH*), ETF:ubiquinona oxidoreductase (ETF:QO; EC 1.5.5.1) [63, 64, 67, 68]. As duas subunidades da ETF são codificadas pelos genes nucleares *ETFA* e *ETFB* os quais se encontram localizados, respectivamente, nos cromossomas humanos 15q23-25 e 19q13.3 [63, 64]. A subunidade alfa é sintetizada com uma sequência precursora, a qual é clivada depois do importe para o interior da mitocôndria, originando a subunidade madura de 30 kDa [63, 69]. A subunidade beta, contrariamente à subunidade alfa, é sintetizada numa forma indistinguível da forma mitocondrial, não possuindo pré-sequências cliváveis [63, 69].

A ETF encontra-se presente na matriz mitocondrial como um heterodímero que consiste de uma subunidade alfa de 30 kDa (ETF $\alpha$ ) e de uma subunidade beta de 28 kDa (ETF $\beta$ ) e contém um FAD como grupo prostético, e uma molécula adenosina monofostato (AMP) por heterodímero (figura 1.9) [46, 63, 64, 68-71]. A ETF é constituída por três domínios distintos [69]: domínio I - porção N-terminal da subunidade  $\alpha$ ; domínio II - porção C-terminal da subunidade  $\alpha$  e uma porção pequena C-terminal da subunidade  $\beta$ ; e domínio III – maioria da subunidade  $\beta$  (figura 1.9) [46, 69].

Diversas mutações nestes dois genes têm sido descritos [68, 72, 73], sendo, na maioria dos pacientes da MADD, o gene *ETFA* o mais afectado [63]. A maioria das variações detectadas em pacientes são do tipo missense, embora também sejam descritas mutações nonsense e de frameshift [74].

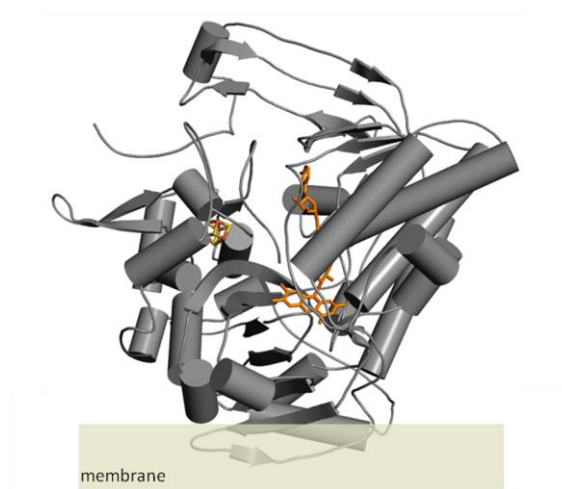


**Figura 1.9 – Representação da estrutura da ETF humana.** O FAD (laranja) liga-se à fenda formada entre a subunidade  $\alpha$  (cinza) e a subunidade  $\beta$  (verde). O AMP (amarelo) localiza-se inteiramente na subunidade  $\beta$ . A estrutura foi obtida usando o programa *Pymol* (PDB:1efv).



A outra proteína afectada na MADD é a ETF:QO, a qual é responsável pela canalização dos electrões para a cadeia respiratória. A ETF:QO é uma proteína monomérica de 64 kDa, integrada na membrana interna da mitocôndria via uma hélice anfipática, e contem uma molécula FAD e um cluster 4Fe-4S (figura 1.10) [63, 64, 68]. O cluster 4Fe-4S localiza-se próximo da superfície da proteína, enquanto o FAD se localiza próximo da ubiquinona tendo sido especulado que o cluster redox é o aceitador dos electrões da ETF e o cofactor flavina o aceitador dos electrões da ubiquinona [47].

O gene que codifica a ETF-QO é o *ETFDH* e localiza-se no cromossoma 4q32-q35 [75].



**Figura 1.10 – Representação da estrutura da ETF-QO de porco.** A estrutura da proteína encontra-se representada como um cartoon com hélices representadas por cilindros, folhas- $\beta$  representadas por setas e os cofactores representados por *sticks*. A estrutura foi obtida usando o programa *Pymol* (PDB:2gmj).

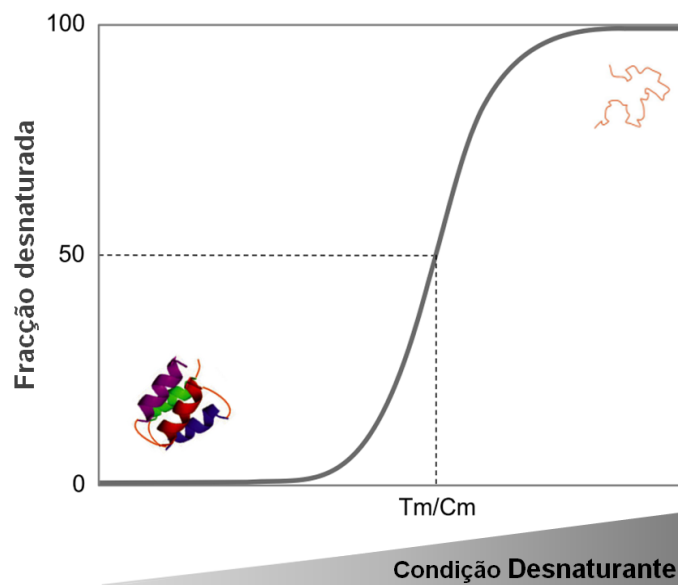
A base genética e a caracterização funcional das mutações associadas à MADD ainda não se encontram bem estabelecidas. As características clínicas dos pacientes que sofrem da MADD são bastante heterogêneas [38] sendo descritos três fenótipos clínicos com variáveis graus de severidade clínica [63]. Uma forma mais severa, letal em recém-nascidos com (tipo I) ou sem (tipo II) anomalias congénitas, e várias formas menos agressivas com expressão tardia (tipo III). Alguns dos pacientes que têm este nível de doença menos severo têm demonstrado uma resposta dramática à riboflavina [64, 76]. Neste momento o único tratamento que tem tido efeitos positivos nesta doença é a suplementação com riboflavina e carnitina.

#### 1.4. Métodos biofísicos para monitorização do *folding* proteico

A estrutura nativa de uma proteína é mantida através de um somatório de interações diferentes tais como: ligações de hidrogénio, interações electrostáticas, interações hidrofóbicas e interações de Van der Waals. Esta estabilidade pode ainda ser reforçada pela formação de ligações covalentes de dissulfureto entre cisteínas localizadas em diferentes partes da cadeia polipeptídica [77].

No estado nativo, ao contrário do estado desnaturado, as cadeias hidrofóbicas encontram-se enterradas no interior da proteína promovendo características estruturais diferentes o que possibilita o uso de uma diversidade de métodos biofísicos para a monitorização da desnaturação.

De uma forma simplista, a desnaturação proteica compreende dois estados, o estado no qual a proteína se encontra na conformação nativa e outro no qual a proteína se encontra numa conformação desnaturada. Entre estes dois estados existe uma zona de transição, sendo o ponto médio de transição entre os estados definido por temperatura de desnaturação térmica ( $T_m$ ), nas desnaturações térmicas; ou concentração de desnaturação química ( $C_m$ ), nas desnaturações químicas. Este ponto médio de transição entre os estados corresponde à desnaturação de 50% das proteínas, figura 1.11 [78-80].



**Figura 1.11 – Representação da curva de desnaturação hipotética.** O  $T_m$  ou o  $C_m$  representam a temperatura ou a concentração de desnaturante químico no ponto médio de transição da curva de desnaturação.

#### 1.4.1. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é um método altamente sensível para análise de *folding* e dinâmica de proteínas uma vez que permite analisar a estrutura terciária das proteínas. Esta análise baseia-se na medida da intensidade e comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência intrínseca das proteínas, a qual é proveniente de resíduos aromáticos tais como a fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp). Este último é o maior contribuinte por ter uma maior absorvância no comprimento de onda de excitação (280 nm) e um maior rendimento quântico de emissão a um comprimento de onda de emissão que varia de ~300-350 nm dependendo da polaridade do solvente [81, 82]. Desta forma, a fluorescência permite avaliar a integridade da estrutura terciária de uma proteína pela observação de um desvio do comprimento de onda de emissão para valores superiores (desvio para o vermelho), resultante da maior exposição dos aminoácidos aromáticos ao solvente polar. Em termos de alteração da intensidade de fluorescência com a desnaturação, esta ocorre de forma muito imprevisível, pois a intensidade pode aumentar ou diminuir dependendo da proteína em estudo [83].

Para além da fluorescência intrínseca por parte dos aminoácidos aromáticos, algumas proteínas são fluorescentes devido aos seus cofactores, tais como o NADH (dinucleótido nicotinamida adenina) e o FAD, respectivamente na forma reduzida e oxidada [84, 85]. Em alguns casos é possível ainda recorrer a fluoróforos extrínsecos tais como o ANS (Ácido 8-anilinaftaleno-1-sulfónico) e a Sypro Orange. Estes apresentam um aumento substancial de intensidade quando ligados às regiões hidrofóbicas das proteínas, as quais se tornam expostas aquando da desnaturação [81].

#### 1.4.2. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD – do inglês *Circular Dichroism*) é um método que permite avaliar rapidamente o *folding* proteico, conteúdo de estruturas secundárias e propriedades de ligação das proteínas [86]. Esta técnica baseia-se na interacção de um feixe de luz polarizada circular com estruturas moleculares portadoras de propriedades quirais, presentes essencialmente nas conformações secundárias, cadeias laterais de aminoácidos aromáticos e pontes dissulfureto [87]. Desta forma, permite monitorizar com elevada sensibilidade alterações na estrutura secundária, bem como alterações na estrutura terciária dependendo da gama de comprimentos de onda utilizados. Na zona de UV-distante (190-250 nm) permite estimar elementos de estrutura secundária, nomeadamente hélices- $\alpha$  (pico negativo característico aos 222 e 208 nm) e

folhas  $\beta$  (pico negativo entre 217-220 nm) [86, 88]. O UV-próximo funciona como uma sonda sensível a alterações topográficas e ambientais na estrutura terciária.

O CD permite ainda estudar a estabilidade de uma proteína por monitorização das alterações do espectro à medida que se alteram as condições do meio (temperatura, pH, concentração de desnaturante) [88].

#### **1.4.3. Varrimento diferencial de fluorescência (DSF)**

A técnica de varrimento diferencial de fluorescência (DSF – do inglês *differential scanning fluorimetry*) baseia-se na utilização de fluoróforos (por exemplo, Sypro Orange) com afinidade para regiões hidrofóbicas que ficam expostas com a desnaturação térmica [78]. O fluoróforo tem uma maior emissão de fluorescência quando associada a regiões hidrofóbicas da proteína e uma menor emissão antes da ligação. Desta forma, permite a distinção de acordo com a emissão de fluorescência, a qual aumenta significativamente e proporcionalmente com o aumento da desnaturação da proteína. Este aumento significativo de emissão de fluorescência é facilmente detectado, permitindo estudar rapidamente a desnaturação proteica em função da temperatura, e determinar a temperatura de desnaturação térmica através da qual é possível avaliar a estabilidade proteica [78-80]. Este método, também designado comercialmente por ThermoFluor, pode ser realizado num instrumento de PCR em tempo real onde se podem obter curvas de desnaturação térmica de uma forma rápida (~1h) para um grande número de amostras (placas de 96 poços), requerendo pequenas quantidades de proteína (1-15  $\mu$ g por poço) [78-80]. Este método permite assim analisar várias condições tais como a presença de diferentes compostos, efeitos de pH e condições de composição óptima de tampões que permitam uma melhor qualidade e tempo de vida das proteínas.

Para além destas técnicas existem ainda outras tais como: a espectroscopia vibracional de infravermelho [89] e Raman [90] que fornecem informação, respectivamente, acerca da estrutura secundária e terciária; e a cristalografia de raio-X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear [91] que possibilitam uma determinação de alta resolução, ao nível atómico, da estrutura tridimensional e dinâmica das proteínas.

Outros métodos não biofísicos podem ser usados para o estudo do *folding* como por exemplo o estudo do *folding* relatado para a proteína acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCAD), na qual se recorreu à marcação selectiva da proteína *in vitro* e subsequente importação para o interior da mitocôndria, permitindo estudar a sua biogénese sem recorrer a métodos imunológicos e no seu habitat natural [4, 92]. É

possível também estudar o *folding in vivo* recorrendo por exemplo à co-expressão de proteínas com chaperões moleculares [74].

### 1.5. Objectivo do trabalho

Um dos objectivos deste trabalho foi investigar o efeito de cofactores e metabolitos mitocondriais como potenciais estabilizadores de duas acil-CoA desidrogenases da  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos - acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCAD) e acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD) - bem como a glutaril-CoA desidrogenase envolvida no metabolismo dos aminoácidos lisina e triptofano.

O outro objectivo do trabalho baseou-se no conhecimento de que a GroEL se liga a uma ampla gama de intermediários de *folding* e no conhecimento de que variantes mutadas são comumente particionadas na GroEL devido a terem uma maior tendência para a agregação e uma estabilidade e eficiência de *folding* diminuída. Assim, o objectivo foi investigar o efeito da chaperonina GroEL como potencial capturador de formas *misfolded* que posteriormente poderão ser recuperadas. Para tal, recorreu-se a estudos de partição pela chaperonina GroEL imobilizada de uma variante mutada da ETF, a ETF-D128N, a qual está associada à doença metabólica. Investigou-se também a partição da variante mutada pelo tão chamado sistema chaperonina/osmólito na presença do cofactor FAD e dois potenciais chaperões químicos (TMAO e sarcosina).



## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Expressão e purificação proteica

**2.1.1. Expressão e purificação das ACDH** – Os cDNAs que codificam as proteínas MCAD, SCAD ou GCD foram inseridos no vector pBluescriptKS(-) (Stragene) na ausência da sequência que codifica o péptido sinal para a mitocôndria, e na presença de um codão de iniciação ATG no N-terminal e uma cauda de histidinas (6xhis + 1xgln) no C-terminal, conforme descrito para o plasmídeo pWT da MCAD [93]. As células de *Escherichia coli* JM109 (Promega) foram transformadas com os plasmídeos da MCAD, SCAD ou GCD e crescidas em meio TB (12g Bacto triptona, 24g de extracto de levedura, 9,4g de fosfato dipotássio, 2,2g de fosfato de potássio e 2mL de glicerol por litro) suplementado com 100  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de ampicilina a 30°C numa incubadora com agitação até uma OD<sub>532</sub> de ~0,5. As células foram depois induzidas com 1 mM de isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (IPTG) durante a noite [58]. As células foram recolhidas por centrifugação e ressuspendidas em 10 mM de hepes, 20 % de etileno glicol a pH 7,8 e 0,5 mM de fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF) na presença de DNase (PVL) e FAD, e partidas na *French press*. Posteriormente realizou-se uma centrifugação (centrífuga Beckman Coulter Avanti J-25I, com o rotor JA-25,5 a 8000 rpm, a 4°C durante 5 min) recolhendo-se o sobrenadante que foi adicionalmente submetido a uma ultracentrifugação (ultracentrifuga Beckman Coulter Optima LE-80, com o rotor 90Ti a 60000 rpm, a 4°C, durante 1 h) [94]. A fracção solúvel foi sujeita a uma purificação por cromatografia de afinidade numa resina de ligação de histidinas, 5 mL His-Trap HP (GE Healthcare), equilibrada em 10 mM hepes, 20 % etileno glicol, 200 mM de NaCl, 10 mM de imidazol e 0,5 mM de PMSF a pH 7,8 (tampão A). A coluna foi lavada com 5 volumes de tampão A, e as proteínas ligadas à coluna foram eluídas por um gradiente crescente de 10-500 mM de imidazol, em tampão A. A SCAD foi eluída como proteína pura aos ~220 mM de imidazol e a MCAD e GCD aos ~160 mM de imidazol. A pureza de todas as fracções foi confirmada por SDS-PAGE 12,5%. As fracções puras foram rapidamente congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C na presença de 2,5 x de excesso de FAD.

**2.1.2. Expressão e purificação da ETF** - As células de *Escherichia coli* JM109 (Promega) foram transformadas com os plasmídeos da ETF, ETF $\alpha$ -Thr171 (correspondente à ETF-WT neste estudo), e ETF $\beta$ -p.D128N [74, 95] e foram crescidas em meio TB (12g Bacto triptona, 24g de extracto de levedura, 9,4g de fosfato dipotássio, 2,2g de fosfato de potássio e 2mL de glicerol por litro) suplementado com 10  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de

canamicina a 30°C numa incubadora com agitação até uma OD<sub>532</sub> de ~0,5. As células foram depois induzidas com 1 mM IPTG durante a noite. As células foram recolhidas por centrifugação, ressuspensas em 10 mM de hepes, 10 % de etileno glicol a pH 7,8 e 0,5 mM de PMSF (tampão A) na presença de DNase (PVL) e FAD, e partidas na *French press*. Posteriormente a fracção solúvel foi recolhida por centrifugação e ultracentrifugação da mesma forma que as ACDH. [94]. Esta fracção foi sujeita a uma purificação por cromatografia de troca aniónica numa resina de 20 mL Q-Sepharose fast flow (GE Healthcare), equilibrada em tampão A. A coluna foi lavada com 5 volumes de tampão A, e as proteínas ligadas à coluna foram eluídas por um gradiente crescente de 0-1 M de NaCl, em tampão A [67, 70, 74]. A ETF foi eluída como proteína pura aos ~250 mM de sal. A pureza de todas as fracções foi confirmada por SDS-PAGE 12,5%. As fracções puras foram rapidamente congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C na presença de 2,5 x de excesso de FAD.

**2.2. Ensaio bioquímicos e enzimáticos** – Os espectros UV-visíveis, e as actividades enzimáticas foram analisados usando um espectrofotómetro Shimadzu UVPC-1601 com agitação. Antes de cada experiência, o excesso de FAD adicionado ao tampão como conservante, foi removido por uma lavagem extensa utilizando ultrafiltração. A concentração das proteínas foi determinada pelo ensaio de Bradford e o conteúdo de FAD foi medido pela absorvância a 450 nm e 436 nm, respectivamente para as ACDH e ETF. Os coeficientes de extinção molar usados foram, respectivamente, para as ACDH e ETF,  $\epsilon_{450\text{nm}}=11300\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  descrito para a flavina livre [96] e  $\epsilon_{436\text{nm}}=13400\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  descrito para a flavina ligada à ETF [95]. Todas as experiências foram realizadas com proteínas contendo uma ocupação completa do sítio de ligação de FAD (>0,9). O tampão usado em todos os ensaios foi 10 mM hepes a pH 7,8. A actividade enzimática das acil-CoA desidrogenases foi medida a 30°C monitorizando-se a redução do 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) a 600 nm, num ensaio com PMS e butiril-CoA, ou octanoil-CoA ou glutaril-CoA, respectivamente para a SCAD, MCAD ou GCD [97]. A unidade de actividade catalítica é definida, nas condições usadas no ensaio, como uma nmol de DCPIP reduzida por minuto. Todas as actividades específicas das ACDH foram baseadas no conteúdo total de flavina.

**2.3. Espectroscopia de dicroísmo circular** - Os espectros de dicroísmo circular foram traçados para as ACDH na região UV-distante (200-260nm) de forma a monitorizar a integridade da conformação *folded* num espectropolarímetro Jasco J-815, com um suporte



de células termostaticamente controlado com um dispositivo *Peltier*. A desnaturação térmica foi monitorizada medindo o sinal de CD a 222 nm, de 25-90°C a uma taxa de 1°C.min<sup>-1</sup>. Foi utilizada uma cuvete de quartzo polarizada de 1mm de percurso óptico (Hellma), e a concentração de proteína foi tipicamente de 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>.

**2.4. Varrimento diferencial de fluorescência** – O varrimento diferencial de fluorescência (DSF) foi usado para determinar a temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) das proteínas na presença de diferentes compostos. Resumidamente, o tampão ou os compostos foram distribuídos na placa de PCR (Bio-Rad), aos quais depois se adicionou em cada poço a solução de proteína (1,2  $\mu$ M) com a Sypro Orange 5x concentrada (Invitrogen). As placas foram seladas com uma fita de vedação de qualidade óptica (Bio-Rad) e analisadas num instrumento de Real-Time PCR iCycler iQ (Bio-Rad) usando um filtro de excitação de 530 a 560 nm e um filtro de emissão de 575 a 595 nm. A temperatura variou de 20 a 90°C, com incrementos de 2°C.min<sup>-1</sup>. Os dados em bruto foram exportados para uma folha de Excel, e as curvas de desnaturação térmica foram obtidas, e os pontos de transição (temperatura de melting,  $T_m$ ) determinados para as 96 condições diferentes em cada ensaio. Os valores de  $T_m$  calculados usando esta metodologia foram idênticos aos monitorizados pelo sinal de CD a 222 nm, validando assim a nossa abordagem. Ver figura 3.2 que representa as curvas de desnaturação térmica determinadas pelo termofluor e determinada por CD para a proteína SCAD.

**2.5. Estudos funcionais em condições de stress térmico** – Para estudar o efeito de alguns compostos na actividade biológica das enzimas usadas como modelo, a sua actividade foi medida depois de estas serem submetidas a stress térmico. Resumidamente, as ACDH (1,2  $\mu$ M) foram incubadas 1h a 40°C na presença de substratos (20  $\mu$ M) ou/e FAD (20  $\mu$ M). A solução de proteína foi adicionada à solução de composto antes da incubação a 40°C. As amostras controlo, na ausência de compostos, foram também preparadas e tratadas nas mesmas condições. A actividade específica para cada proteína foi determinada imediatamente depois de misturada (tempo 0) e depois de 1h de incubação como descrito na secção de ensaios bioquímicos e enzimáticos. Não se observou precipitação das proteínas.

**2.6. Ensaio de partição pela chaperonina GroEL** – Para se estudar o efeito dos chaperões moleculares no folding de uma variante da ETF associada a fenótipos menos severos - ETF $\beta$ -p.Asp128Asn, foram realizados ensaios de partição na chaperonina

GroEL imobilizada em esferas (*beads*) de Sepharose 4 fast flow. Resumidamente, submeteram-se misturas de proteína e GroEL (1proteína:2GroEL) a 35°C com agitação constante, e de 40 em 40 minutos fez-se um *spin down* da mistura, de forma a separar a GroEL imobilizada da fracção solúvel (fracção de proteína não particionada na GroEL) e fizeram-se aliquotas desta. As aliquotas foram aplicadas num SDS-PAGE 12,5% e a quantidade da proteína foi quantificada. Para além da quantificação da proteína, fez-se também uma análise da qualidade da proteína através da realização de espectros de fluorescência. A concentração de partida de proteína e GroEL foram respectivamente, 2  $\mu$ M e 4  $\mu$ M em 10 mM de hepes a pH 7,8. Como controlo da precipitação da proteína, a qual impediria concluir se a quantidade de proteína solúvel diminuiria em resultado da partição pela GroEL ou devido à precipitação da proteína, realizaram-se os mesmos ensaios na ausência de GroEL. Realizaram-se, da mesma forma, ensaios de partição da ETF $\beta$ -p.D128N na presença de FAD (20  $\mu$ M) ou de TMAO ou sarcosina (1M).

**2.7. Espectroscopia de fluorescência** – Os espectros de fluorescência foram traçados para a ETF, durante os ensaios de partição na GroEL, usando um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse com uma cuvete de quartzo de 500  $\mu$ l a 30°C. A emissão dos triptofanos foi monitorizada utilizando um comprimento de onda de excitação de 280 nm. A emissão foi registada entre os 300 e os 500 nm A fenda de excitação foi de 5 nm e de emissão de 10 nm, a voltagem do detector foi de 600 V. A concentração inicial de proteína usada nestes estudos foi de 2  $\mu$ M.

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

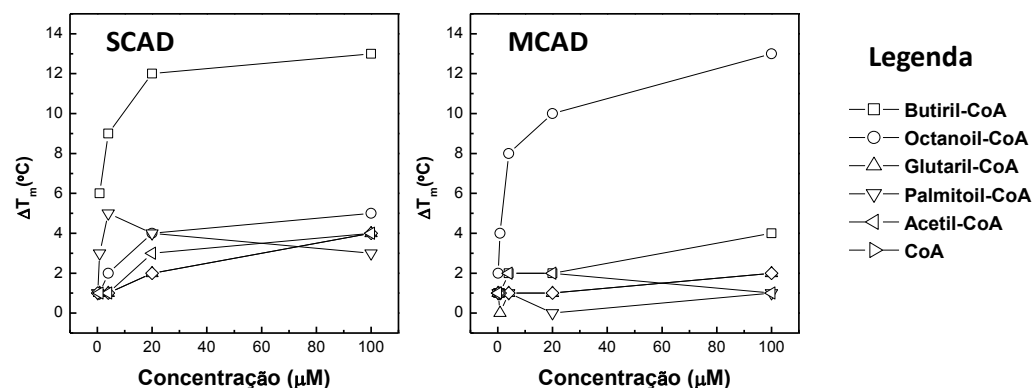
#### 3.1. Recuperação de defeitos no *folding* proteico por pequenos chaperões farmacológicos\*

Os cofactores, substratos e inibidores pertencem ao grupo dos chaperões farmacológicos conhecidos pelo seu potencial para exercerem uma estabilização directa no *fold* das proteínas, sendo capazes de recuperar conformações *misfolded* por exemplo por efeitos via nucleação as quais restabelecem as interações nativas e/ou promovem o estado oligomérico correcto.

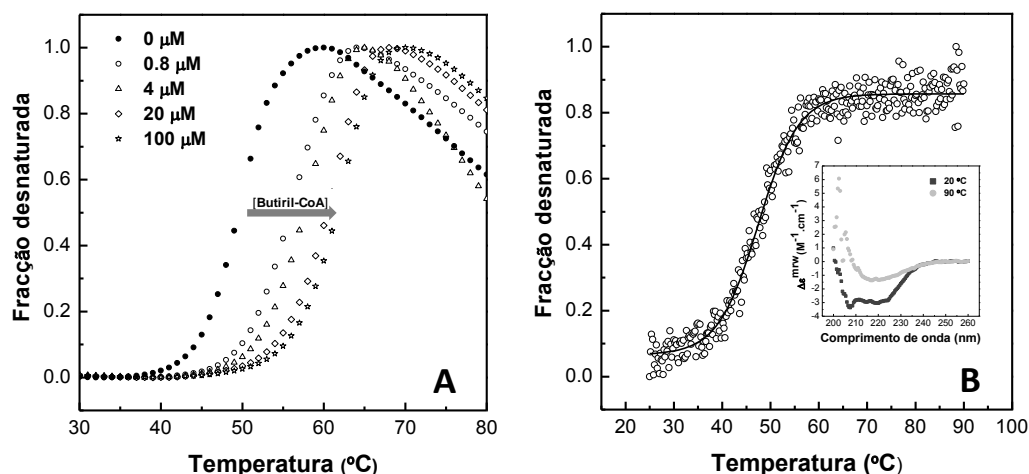
##### 3.1.1. Efeito dos substratos na estabilidade das ACDH em condições fisiológicas

O efeito de diversos substratos para três ACDH – acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCAD), acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD) e glutaril-CoA desidrogenase (GCD) – foi investigado *in vitro* recorrendo à técnica de varrimento diferencial de fluorescência (DSF), uma técnica que permite um rápido *screen* de uma variedade de condições (96) em apenas 1h. De forma a se tentarem imitar as condições encontradas na mitocôndria, procuraram-se usar concentrações muito próximas das fisiológicas [98], as quais estiveram presentes, em todos os estudos, em concentrações na ordem dos micromolar (0,8-100  $\mu$ M). Tendo em conta ainda esta abordagem, tentaram-se simular as condições mitocondriais de disfunção das ACDH, nas quais os níveis de substrato e metabolitos se encontram aumentados. Para tal, fez-se um *screen* do efeito do butiril-CoA, octanoil-CoA, glutaril-CoA, palmitoil-CoA, acetil-CoA e CoA na estabilidade térmica das proteínas medindo-se a temperatura de desnaturação térmica ( $T_m$ ) em função do aumento da concentração de substrato (figura 3.1 e tabela A1 em anexo). Na figura 3.2A encontra-se a título de exemplo, as curvas de desnaturação determinadas por DSF para a proteína SCAD na presença de butiril-CoA, onde se observa um aumento do  $T_m$  em função da concentração. O valor do  $T_m$  para cada uma das proteínas em estudo foi confirmado pela espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Na figura 3.2B encontra-se representada, como exemplo, a curva de desnaturação obtida por CD para a proteína SCAD. Os valores de  $T_m$  determinados pelas duas técnicas mostraram ser concordantes para as três proteínas em estudo. Por exemplo para a proteína SCAD este foi de 50°C e 47,5°C determinado, respectivamente, por DSF e por CD, mostrando uma variação que se encontra dentro do erro das técnicas usadas.

\*Os resultados apresentados nesta secção encontram-se publicados em: Lucas *et al* (2011) “Cofactors and metabolites as potential stabilizers of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases”, *Biochim Biophys Acta - Molecular Basis of Disease*, **1812** (12): p. 1658-1663, (ver anexo 2)



**Figura 3.1 – Dependência da concentração de substrato na estabilidade térmica das ACDH.** A estabilidade térmica da SCAD e MCAD foi determinada por DSF na presença de diferentes concentrações de metabolitos e substratos: butiril-CoA ( $\square$ ), octanoil-CoA ( $\circ$ ), glutaril-CoA ( $\triangle$ ), palmitoil-CoA ( $\nabla$ ), acetil-CoA ( $\diamond$ ) e CoA ( $\triangleright$ ). É mostrada a variação da estabilidade ( $\Delta T_m$ ) das proteínas comparada com o controle para o qual a temperatura de desnaturação térmica foi determinada na ausência da adição de qualquer molécula ( $T_m=50^{\circ}\text{C}$  para a SCAD e  $T_m=54^{\circ}\text{C}$  para a MCAD). A concentração de proteína foi  $1,2\ \mu\text{M}$  e a concentração de composto variou de  $0,16$  a  $100\ \mu\text{M}$ , em  $10\ \text{mM}$  de hepes a pH 7,8. Ver materiais e métodos para detalhes e a tabela A1 dos anexos.



**Figura 3.2 - Curvas de desnaturação térmica.** PAINEL A - desnaturação térmica da proteína SCAD na presença de diferentes concentrações de butiril-CoA determinada por DSF. A concentração de proteína foi de  $1,2\ \mu\text{M}$  em  $10\ \text{mM}$  de hepes a pH 7,8. Ver tabela A1 para detalhe. PAINEL B – desnaturação térmica da proteína SCAD e representação dos espectros obtidos no início ( $20^{\circ}\text{C}$ ) e no final ( $90^{\circ}\text{C}$ ) da desnaturação. A concentração de proteína foi de  $0,15\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  em  $10\ \text{mM}$  de hepes a pH 7,8. O valor de  $T_m$  determinado por DSF e por CD para a proteína SCAD foi respectivamente,  $50^{\circ}\text{C}$  e  $47,5^{\circ}\text{C}$ .

Os resultados obtidos mostraram que os substratos preferidos (butiril-CoA e octanoil-CoA, respectivamente) da SCAD e MCAD têm um efeito substancial na estabilidade térmica ( $\Delta T_m \approx +12^{\circ}\text{C}$ ). Estes substratos preferidos mostraram também um

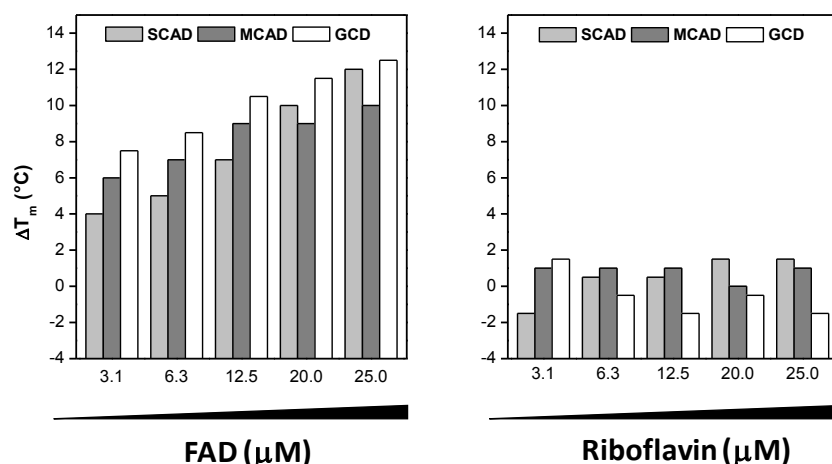
efeito substancial mesmo para concentrações muito baixas, tendo-se para a concentração de 20  $\mu$ M mais de 80% do efeito máximo de estabilização, observado para a concentração de substrato mais elevada (100  $\mu$ M). Para as restantes moléculas testadas, não se observou uma estabilização tão substancial como para os substratos preferidos, mesmo assim, foi observada alguma estabilização de menor magnitude ( $\Delta T_m < 4^\circ\text{C}$ ). Contudo, a estabilização conformacional induzida pelos substratos não parece ser uma propriedade partilhada por todas as acil-CoA desidrogenases em geral, devido a não ter sido observado qualquer efeito para o glutaril-CoA na GCD (tabela A1 em anexo) nem na presença das restantes moléculas. Estas diferenças observadas entre as ACDH sugerem que estas proteínas, embora partilhem uma estrutura nativa comum, possuem propriedades conformacionais moduladas por mecanismos distintos, um processo que possivelmente relaciona as diferenças na dinâmica das proteínas. Uma possível explicação poderá ser que a ligação do substrato à proteína GCD resulta, de alguma maneira, em alterações conformacionais diferentes das que ocorrem na SCAD e MCAD, as quais não conduzem a uma estabilização da estrutura da proteína GCD e reflectem diferenças entre as propriedades dinâmicas destas enzimas. Para a SCAD e MCAD o efeito estabilizador induzido pelo substrato sugere que o mecanismo de estabilização ocorre através de um efeito local no sítio activo de ligação do substrato e é propagado para a proteína global.

### **3.1.2. Efeito do cofactor FAD, mas não do seu precursor riboflavina na estabilização das ACDH**

Investigou-se posteriormente se o FAD, o cofactor comum presente em todas as acil-CoA desidrogenases, tem também uma acção estabilizadora nas ACDH. Este efeito do cofactor FAD na estabilização das ACDH foi analisado empregando a mesma metodologia usada para os substratos e metabolitos. Resumidamente, fez-se um *screen* do efeito do FAD nas diferentes proteínas (com uma concentração final de 1,2  $\mu$ M) medindo-se a temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) em função do aumento da concentração de FAD de 3 a 25  $\mu$ M. Antes de qualquer adição de FAD foi verificada a razão de FAD/mol de proteína, a qual foi superior a 0,9 para todas as ACDH. Os resultados obtidos mostraram que o FAD tem um efeito estabilizador nas ACDH em estudo (SCAD, MCAD e GCD), resultando num considerável aumento do  $T_m$  (figura 3.3 e tabela A2 em anexo).

Com o intuito de se perceber melhor se a estabilização por parte do FAD era específica ou não, ou se essa estabilização era promovida por interacções mediadas pelo

anel isoaloxazina, investigou-se também o efeito da riboflavina, o precursor do FAD. Os resultados revelaram ausência de estabilização para as concentrações e condições testadas (figura 3.3 e tabela A2 em anexo), sugerindo que a estabilização não se deve em geral ao anel isoaloxazina, sendo específica para o FAD. Assim, este resultado sugere que a dissociação do cofactor durante o stress térmico pode ser compensada pelo FAD exógeno, o qual é conhecido por estar aumentado em pessoas medicadas com suplemento do precursor biossintético riboflavina [99]. A relevância destas observações é que uma grande significativa estabilização é atingida para uma concentração de FAD (20  $\mu\text{M}$ ) que se encontra dentro da gama de concentrações encontradas na célula [98].

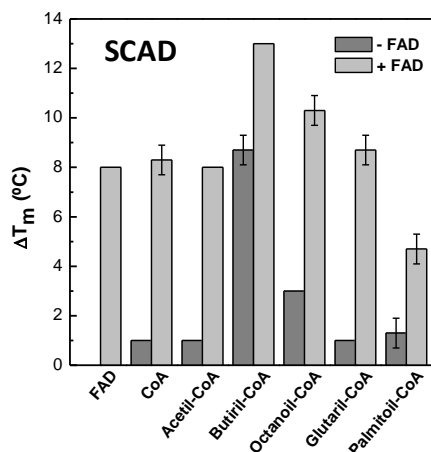


**Figura 3.3 - Efeito do FAD e riboflavina na estabilidade térmica das ACDH.** O efeito do FAD e riboflavina na estabilidade térmica da SCAD, MCAD e GCD (1,2  $\mu\text{M}$ ) foi determinado para várias concentrações (3,1-25  $\mu\text{M}$ ) em 10 mM de hepes a pH 7,8. As barras indicam a variação da estabilidade ( $\Delta T_m$ ) das proteínas em relação ao controlo. Note por favor que o eixo dos xs não cruza o  $y=0$ . Ver materiais e métodos para detalhes e tabela A2 em anexo.

### 3.1.3. Combinação da estabilização do cofactor e dos substratos aditiva

Tendo-se estabelecido que os cofactores e metabolitos mitocondriais são potenciais estabilizadores das flavoproteínas desidrogenases da  $\beta$ -oxidação, investigou-se o seu possível efeito sinérgico. Para tal, foi analisado o valor de  $\Delta T_m$  obtido para a SCAD na presença dos diferentes metabolitos e, em paralelo, na presença da combinação destes com um excesso moderado de FAD (20  $\mu\text{M}$ ) (figura 3.4, tabela A3 em anexo). Os resultados obtidos mostraram que as combinações testadas estabilizam a SCAD e que essa estabilização é quase aditiva em relação ao observado para os ensaios em que é analisado o efeito individual das moléculas (figura 3.4). Esta observação está de acordo com os resultados descritos nas secções anteriores deste estudo, uma vez que confirma que os substratos e o cofactor estabilizam as proteínas através de mecanismos diferentes: os substratos pela ligação ao centro activo da enzima, e o cofactor por deslocar o

equilíbrio dissociação-associação do cofactor para o estado de associação às proteínas. O que é muito interessante de se notar é que a combinação do butiril-CoA e FAD aumenta substancialmente a temperatura de desnaturação da SCAD. Isto ilustra como a conformação de uma ACDH pode ser efectivamente resgatada por pequenos ligandos, neste caso metabolitos mitocondriais naturais em concentrações muito baixas.

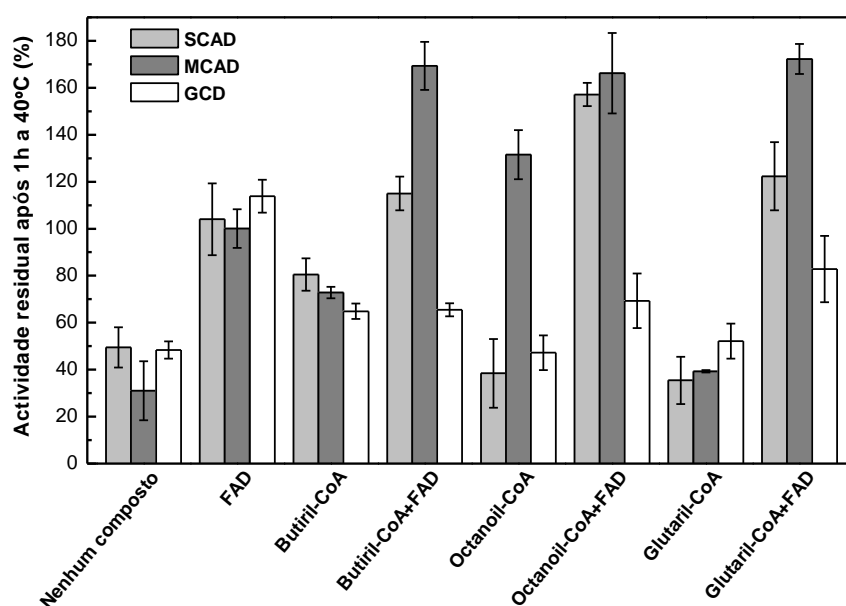


**Figura 3.4 - Efeito combinatório do FAD e dos metabolitos na estabilidade da SCAD.** A estabilidade térmica da SCAD (1,2  $\mu$ M) na presença de CoA, acetil-CoA, butiril-CoA, octanoil-CoA, glutaril-CoA ou palmitoil-CoA (20  $\mu$ M) foi determinada na presença e ausência de FAD (20  $\mu$ M). As barras indicam a variação da estabilidade ( $\Delta T_m$ ) das proteínas em relação ao controlo. As experiências foram efectuadas com um  $n=3$ . Ver materiais e métodos para detalhe e tabela A3 em anexo.

#### 3.1.4. Os cofactores e metabolitos previnem a perda de actividade durante stress térmico moderado

Em alguns casos, a estabilização substancial das proteínas por pequenas moléculas conduz à rigidificação da estrutura das proteínas que, por sua vez, diminui a sua dinâmica e flexibilidade acabando por comprometer a sua actividade biológica [100]. De forma a se investigar se a estabilização das ACDH em estudo por parte dos substratos e do cofactor FAD não comprometia a actividade destas, realizaram-se estudos enzimáticos nos quais se submeteram as proteínas (SCAD, MCAD e GCD) a uma incubação durante 1h a 40°C na presença e ausência de FAD e em combinação com os substratos (butiril-CoA, octanoil-CoA e glutaril-CoA). As actividades das proteínas foram determinadas antes da incubação na presença dos respectivos aditivos e após 1h a 40°C, condição que simula episódios de febre e está associada às doenças da FAO. Os resultados mostraram para o controlo, proteína sem a adição de qualquer composto, uma actividade residual de 49%, 31% e 48% respectivamente para a SCAD, MCAD e GCD (Figura 3.5, tabela A4 em anexo). Este decaimento na actividade enzimática foi prevenido, em todos os casos, pela

presença de concentrações baixas de FAD (20  $\mu\text{M}$ ) durante o stress térmico. Esta prevenção foi observada igualmente para os substratos preferidos (butiril-CoA para a SCAD e octanoil-CoA para a MCAD). Quando se combinou os substratos preferidos com o cofactor flavina foi observada uma activação enzimática adicional. Estes resultados estão assim, de acordo com o aumento substancial da estabilidade das proteínas pelos substratos e cofactor, e mostram que a estabilização conformacional não sacrifica a actividade catalítica. Em relação aos substratos não específicos, os resultados mostraram um efeito substancial na prevenção da perda de actividade durante as condições de stress térmico do ensaio. Um exemplo é o caso do butiril-CoA para a proteína MCAD: na presença de 20  $\mu\text{M}$  de butiril-CoA tinha-se apenas um modesto aumento na temperatura de desnaturação térmica ( $\Delta T_m \approx +2^\circ\text{C}$ ), mas preveniu a perda de actividade durante 1h a  $40^\circ\text{C}$ , fornecendo uma actividade residual de 73% (versus 31% na sua ausência). Por outro lado, o glutaril-CoA devido não ser substrato da SCAD nem da MCAD, não teve um efeito na prevenção da perda de actividade. Em sumário, estes resultados ilustram o princípio da estabilização cinética por ligação de uma molécula no sítio activo que conduz à estabilização da conformação, permitindo uma actividade residual alta no final de 1h a  $40^\circ\text{C}$ .



**Figura 3.5 – Recuperação da actividade das ACDH em condições de stress térmico pelos substratos e FAD.** A actividade residual após stress térmico (1h a  $40^\circ\text{C}$ ) foi determinada para a SCAD, MCAD e GCD sem a adição de nenhum composto, na presença de FAD (20  $\mu\text{M}$ ), na presença dos substratos butiril-CoA, octanoil-CoA e glutaril-CoA (20  $\mu\text{M}$ ), e na presença da combinação dos substratos (20  $\mu\text{M}$ ) e FAD (20  $\mu\text{M}$ ). A concentração das proteínas foi de 1,2  $\mu\text{M}$ , em 10 mM de hepes a pH 7,8. Os valores de actividade residual foram calculados em relação à actividade ao tempo zero, para cada uma das condições testadas. As experiências foram efectuadas com um  $n=3$ . Ver materiais e métodos para detalhe e tabela A4 em anexo.



### 3.2. Recuperação de defeitos no *folding* proteico por chaperões moleculares

Os chaperões moleculares são conhecidos por auxiliarem o *folding* de proteínas *in vivo*. Um exemplo muito estudado e utilizado como estratégia na recuperação de defeitos de *folding* tem sido o uso da chaperonina GroEL, a qual tem a capacidade de encapsular proteínas *misfolded* no seu interior permitindo que ocorra o *refolding* proteico.

#### 3.2.1. Efeito da GroEL no *folding* da ETF $\beta$ -p.D128N

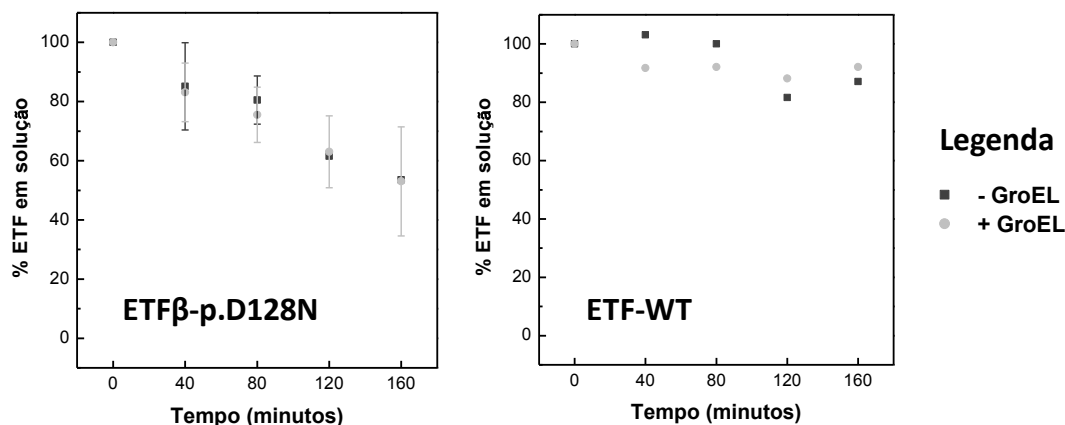
Como referido anteriormente, mutações nos genes que codificam a subunidade  $\alpha$  e  $\beta$  da ETF têm resultado no comprometimento da transferência de electrões entre 11 flavoproteínas desidrogenases e a cadeia de transporte electrónico. A mutação Asp128Asn na subunidade  $\beta$  (ETFp.Asp128Asn) tem estado associada à doença metabólica MADD e tem sido mostrada por afectar a estrutura terciária e diminuir a actividade específica da proteína [67]. Para além disso, esta mutação na ETF tem um efeito destabilizador no processo de *folding*, tornando a proteína susceptível ao *misfolding* e agregação, ou à degradação [74]. Mais especificamente, a mutação localiza-se perto da interface do dímero e estabelece contactos com resíduos que pertencem ao local de ligação do cofactor FAD [74]. Esta mutação permite que o mutante mantenha o *folding* global da ETF-WT mas, em condições de stress, o cofactor FAD torna-se menos fortemente ligado conduzindo a uma maior destabilização da proteína [67].

Com o intuito de se avaliar o efeito da mutação ETF $\beta$ -p.D128N na dinâmica conformacional da proteína e o efeito da chaperonina GroEL no *folding* desta, procedeu-se à análise da partição da ETF na GroEL. A GroEL tem a vantagem de poder ser utilizada tanto na forma solúvel como na forma imobilizada. Estudos usando as duas formas têm mostrado que a capacidade da GroEL para se ligar a estruturas proteicas *unfolded* ou parcialmente *folded* é idêntica [24, 36]. Nestes estudos usou-se a GroEL imobilizada em esferas (*beads*) de Sepharose 4 fast flow, uma plataforma recentemente desenvolvida [24] que tem a vantagem de permitir uma avaliação da partição na GroEL de forma mais fácil e imediata. O ensaio consiste em fazer um pequeno *spin down* para separar a fracção insolúvel (GroEL imobilizada e proteína particionada) da fracção solúvel (proteína não particionada) que é posteriormente analisada.

Os primeiros estudos tiveram como objectivo a optimização do processo de partição por parte do mutante no chaperão molecular. Incubou-se a ETF $\beta$ -p.D128N a 40°C durante 2h, fazendo-se aliquotas de 40 em 40 minutos que foram posteriormente analisadas por SDS-PAGE. Observou-se a precipitação da proteína, o que não permitiria depois concluir se a proteína em solução diminuiria por estar a ser particionada na GroEL

ou por estar a precipitar. Experimentou-se então uma temperatura menor, de 35°C, na tentativa de se diminuir essa precipitação da ETF $\beta$ -p.D128N. Contudo, estes resultados mostraram que a proteína precipita também nestas condições. Uma vez que temperaturas mais baixas poderiam comprometer a actividade da GroEL (a qual é uma proteína de choque térmico e funciona melhor para temperaturas mais elevadas) e temperaturas mais elevadas conduzem à precipitação da ETF $\beta$ -p.D128N, usou-se a temperatura de 35°C de forma a ter-se um equilíbrio entre o nível de precipitação e partição da ETF na GroEL.

Devido à instabilidade da ETF $\beta$ -p.D128N e tendência para precipitar fizeram-se ensaios controlo de precipitação da proteína na ausência de GroEL. Os ensaios de partição foram realizados para a ETF-WT e a variante clínica ETF $\beta$ -p.D128N. Resumidamente, submeteram-se misturas de proteína e GroEL numa estequiometria de 1:2 a 35°C com agitação constante, e de 40 em 40 minutos fez-se um *spin down* da mistura e a fracção solúvel (proteína não particionada) foi analisada e quantificada por SDS-PAGE. Os resultados obtidos (figura 3.6, esquerda) demonstram um perfil idêntico na ausência e presença de GroEL para a ETF $\beta$ -p.D128N, não permitindo concluir se o decaimento da % de proteína na presença de GroEL resulta da precipitação ou partição nesta. A GroEL pode estar a exercer um efeito de *crowding* que pode favorecer a estabilidade da proteína impedindo que a proteína precipite e acabe por ser particionada. Em relação aos resultados comparativos para a ETF-WT, estes demonstram que a proteína não estava a precipitar (figura 3.6, direita na ausência de GroEL) e que a proteína não é particionada na GroEL (figura 3.6, direita na presença de GroEL). Estes resultados indicam assim a manutenção da estabilidade da proteína ao longo do tempo e sugerem que a proteína ETF-WT, mesmo quando submetida a uma moderada temperatura de 35°C, se mantém com um *fold* correcto.



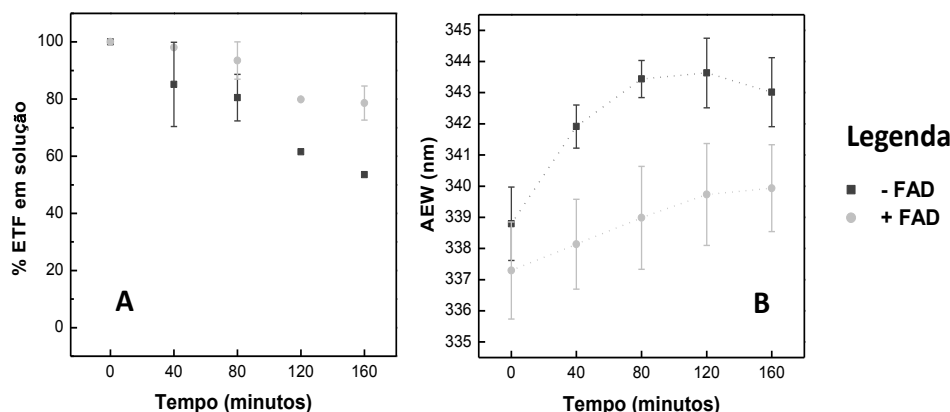
**Figura 3.6 - Efeito da GroEL na ETF quando submetida a uma temperatura moderada de 35°C.** Análise densitométrica das bandas do SDS-PAGE para a variante mutada ETFβD128N (esquerda) e para a ETF-WT (direita). O ponto inicial (antes das proteínas serem incubadas) corresponde a 100%. Amostras independentes foram incubadas em 10 mM de hepes na ausência (■) e presença (●) de GroEL a 35 °C. A concentração de proteína e GroEL foram respectivamente 2 e 4 μM. As experiências foram efectuadas com um n=2 para a ETFβ-p.D128N e com n=1 para a ETF-WT. Ver tabela A5 em anexo para detalhe.

### 3.2.2. FAD previne a precipitação da ETFβ-p.D128N

Com o objectivo de se diminuir a precipitação da ETFβ-p.D128N de forma a se tentar encontrar uma condição que permitisse concluir que nos ensaios de partição a percentagem de proteína em solução diminui em resultado da partição da ETF na GroEL e não da precipitação, pensou-se em adicionar FAD aos ensaios. A adição do cofactor FAD como estratégia para se diminuir a precipitação da ETFβ-p.D128N baseou-se no facto de este ter demonstrado um substancial efeito na estabilidade térmica das suas parceiras desidrogenases e no facto de já ter sido previamente demonstrado por Henriques et al [67] o seu importante efeito estabilizador na ETF sob condições de stress térmico moderado. Para tal incubaram-se amostras individuais de proteína (2 μM) na presença de 20 μM de FAD (mesma concentração usada nos ensaios de estabilidade das ACDH) a 35°C e fizeram-se aliquotas de 40 em 40 minutos, as quais foram analisadas por SDS-PAGE e por espectroscopia de fluorescência.

Os resultados obtidos por SDS-PAGE revelam um decréscimo de precipitação ao longo do tempo (figura 3.7A). A análise da proteína por espectroscopia de fluorescência baseou-se no conhecimento de que um desvio do comprimento de onda médio (AEW – do inglês average emission wavelength) para valores superiores é indicativo de que a proteína está a perder estrutura terciária. Assim, procedeu-se à análise da diminuição dos contactos da estrutura terciária da proteína tendo em conta a variação do AEW na região dos triptofanos (300-450 nm) na presença e ausência de FAD. Os resultados mostraram

que a presença de FAD permite uma diminuição do AEW de ~344 (na ausência de FAD) para ~340 nm aos 120 minutos (figura 3.7B). Isto indica que o FAD contribui para a manutenção dos resíduos aromáticos num ambiente menos acessível ao solvente prevenindo a perda da estrutura terciária da proteína e, por conseguinte, possibilita que a proteína se encontre mais estável e a precipitação seja prevenida. Colocou-se assim a possibilidade de que a realização dos ensaios de partição na presença de FAD possa trazer resultados conclusivos acerca da partição da ETF $\beta$ -p.D128N na GroEL.



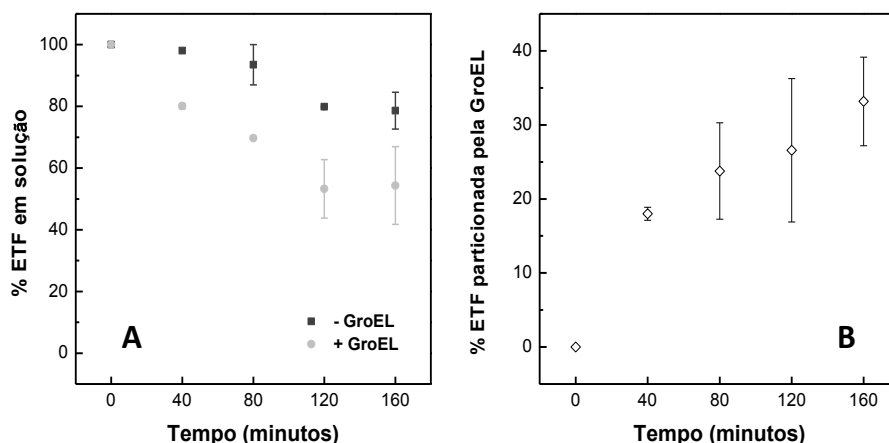
**Figura 3.7 - Efeito do FAD na ETF $\beta$ -p.D128N quando submetida a uma temperatura moderada de 35°C.** No *painel A* está representada a análise densitométrica das bandas do SDS-PAGE. O ponto inicial (antes das proteínas serem incubadas) corresponde a 100%. No *painel B* está representada a análise da diminuição dos contactos da estrutura terciária determinada a partir da variação do comprimento de onda médio na região dos triptofanos (300-450 nm). Amostras independentes foram incubadas em 10 mM de hepes na ausência (■) e presença (●) de FAD a 35 °C. A concentração de proteína e FAD foram respectivamente 2 e 20  $\mu$ M. As experiências foram efectuadas com um n=2. Ver tabela A6 em anexo para detalhe.

### 3.2.3. Efeito da combinação da GroEL e do FAD no folding da ETF $\beta$ -D128N

Uma vez encontrada a condição que minimiza a precipitação da variante, realizaram-se os ensaios de partição da ETF $\beta$ -p.D128N na GroEL na presença de 20  $\mu$ M de FAD procedendo-se da mesma forma que na ausência deste.

Os resultados revelam um decréscimo na percentagem de proteína em solução na presença de GroEL (figura 3.8A) sugerindo que a proteína está a ser particionada. A percentagem de proteína particionada ao longo do tempo na GroEL encontra-se representada na figura 3.8B onde se observa um aumento de partição ao longo do tempo. Isto indica que à medida que a proteína é destabilizada, por estar submetida a uma temperatura moderada, é particionada na GroEL, tendo-se no final de 160 minutos ~35% de proteína particionada. Estes resultados demonstram que o FAD, apesar de estabilizar a proteína prevenindo a sua precipitação, não conduz, pelo menos de forma acentuada, a alterações conformacionais na proteína que revertam defeitos encontrados na ETF $\beta$ -

p.D128N e a impedem de ser particionada na GroEL. Contudo, não é possível estimar o efeito do FAD na recuperação do defeito conformacional encontrado na ETF $\beta$ -p.D128N uma vez que não temos um controlo conclusivo para a partição de proteína na ausência deste. Ressalva-se assim que a percentagem de proteína particionada na presença de FAD possa ser superior aos ~35%. Em resumo, estes resultados sugerem que as variantes conformacionais possam ser auxiliadas por chaperões moleculares no processo de *folding*, suscitando a possibilidade deste papel pela homóloga mHsp60 presente nas mitocôndrias.



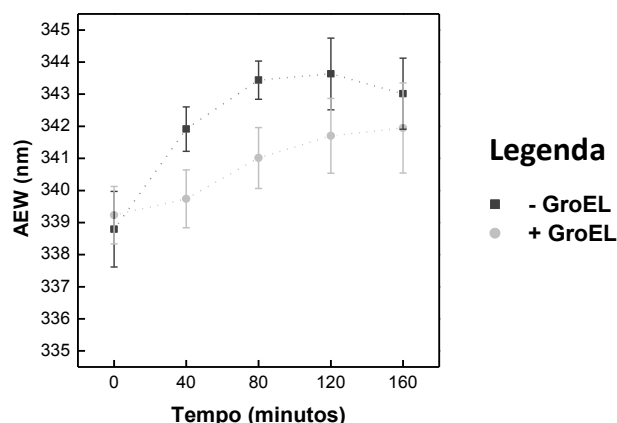
**Figura 3.8 - Efeito da GroEL na ETF $\beta$ -p.D128N quando submetida a uma moderada temperatura de 35°C na presença de FAD.** No *painel A* está representada a análise densitométrica das bandas do SDS-PAGE. O ponto inicial (antes das proteínas serem incubadas) corresponde a 100%. No *painel B* está representada a percentagem de proteína particionada pela GroEL ao longo do tempo. Amostras independentes foram incubadas em 10 mM de hepes e 20  $\mu$ M de FAD, na ausência ( $\blacksquare$ ) e presença ( $\bullet$ ) de GroEL a 35 °C. A concentração de proteína, GroEL e FAD foram respectivamente 2, 4  $\mu$ M. As experiências foram efectuadas com um n=2. Ver tabela A7 em anexo para detalhe.

### 3.2.4. Partição da ETF $\beta$ -p.D128N na ausência de FAD (?)

De forma a se tentar perceber se na ausência de FAD a ETF $\beta$ -p.D128N estava ou não a ser particionada na GroEL, procedeu-se à análise da diminuição dos contactos da estrutura terciária da proteína, tendo em conta os valores de AEW na região dos triptofanos (300-450 nm), com recurso à espectroscopia de fluorescência. Os resultados obtidos (figura 3.9) mostram uma diferença, apesar de pequena, no AEW obtido para a ETF $\beta$ -p.D128N na ausência e presença de GroEL. Observa-se uma maior variação do AEW para a proteína na ausência de GroEL (até ~120 minutos), o que sugere que a proteína esteja mais desnaturada.

Visto ter-se a mesma quantidade de proteína em solução (observada pelo SDS-PAGE, figura 3.6) e um perfil de desnaturação diferentes (figura 3.9) pode indicar que a precipitação também seja diferente. Pode haver mais precipitação na ausência de GroEL,

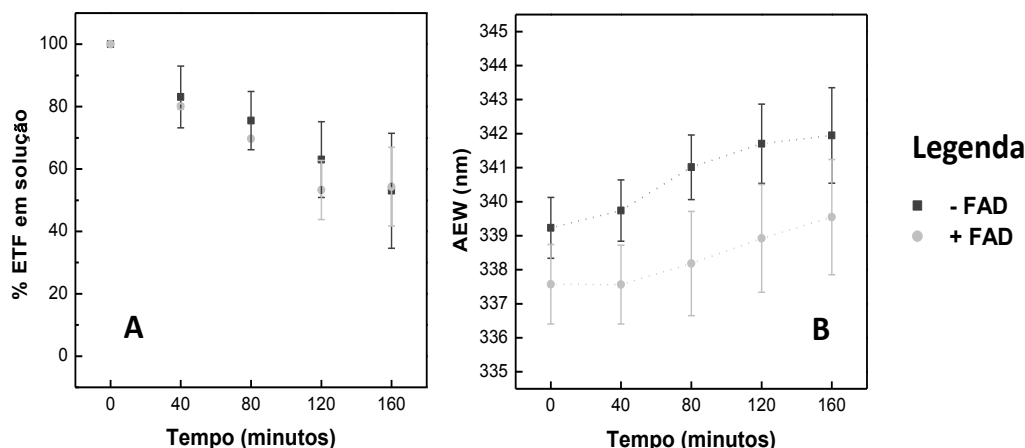
o que coloca a hipótese de que, para se ter a mesma quantidade de proteína em solução, a proteína na presença de GroEL possa estar a ser particionada. Em resultado disso ter-se-ia a diminuição da proteína mais desnaturada em solução uma vez que esta estaria a ser particionada, e a fluorescência apenas seria representativa da proteína menos desnaturada, resultando assim num menor desvio do comprimento de onda de emissão médio.



**Figura 3.9 - Efeito da GroEL na ETFβ-p.D128N quando submetida a uma temperatura moderada de 35°C determinado por espectrofotometria de fluorescência.** Análise da diminuição dos contactos da estrutura terciária da ETFβ-p.D128N determinada a partir da variação do comprimento de onda médio na região dos triptofanos (300-450 nm). Amostras independentes foram incubadas em 10 mM de hepes na ausência (■) e presença (●) de GroEL a 35 °C. A concentração de proteína e GroEL foram respectivamente 2 e 4 μM. As experiências foram efectuadas com um n=2. Ver tabela A8 em anexo para detalhe.

Analizou-se ainda a combinação do perfil de desnaturação térmica analisado pela variação do AEW na presença de GroEL e na presença de GroEL e FAD. Esta combinação resultou num perfil semelhante, no qual se tem, para ambos os casos, uma diferença de ~3 nm entre o valor de AEW final e inicial (figura 3.10B). Isto sugere que a taxa de desnaturação é semelhante nos dois casos. No entanto, na presença de FAD observam-se valores de AEW inferiores devido à estabilização da proteína em solução por parte do FAD (figura 3.10B). Por último combinaram-se o perfil de partição da GroEL na presença de FAD e o possível perfil de partição na ausência de FAD, o que resultou numa sobreposição dos valores de percentagem de proteína em solução, proteína não particionada (figura 3.10A). Estes resultados sugerem assim, que a proteína esteja a ser particionada na ausência de FAD. Contudo, são apenas sugestões dado estes resultados se encontrarem ainda numa fase preliminar, sendo necessária a realização de experiências posteriores. Uma experiência que poderá ser realizada e poderá trazer alguma solidez a estas sugestões será testar a partição da ETFβ-p.D128N na GroEL na forma solúvel através da monitorização da actividade da proteína ao longo do tempo,

como se encontra descrito para a ETF-WT em [70]. Resumidamente, poderá incubar-se a proteína durante 160 minutos a 35°C na presença e ausência de GroEL e medir-se a actividade ao longo do tempo. Caso a proteína esteja a ser particionada e a GroEL melhore a conformação desta, espera-se uma actividade residual superior na presença de GroEL.

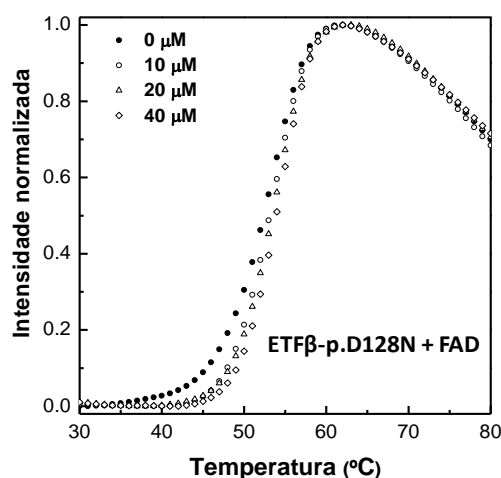


**Figura 3.10 - Efeito da GroEL na ETFβ-p.D128N durante o stress térmico na presença e ausência de FAD.** No *painel A* está representada a análise densitométrica das bandas do SDS-PAGE. O ponto inicial (antes das proteínas serem incubadas a 35°C) corresponde a 100%. No *painel B* está representada a análise da diminuição dos contactos da estrutura terciária determinada a partir da variação do comprimento de onda médio na região dos triptofanos (300-450 nm). Amostras independentes foram incubadas em 10 mM de hepes na ausência (■) e presença (●) de FAD a 35 °C. A concentração de proteína e FAD foram respectivamente 2 e 20  $\mu$ M. As experiências foram efectuadas com um n=2. Ver tabela A9 em anexo para detalhe.

### 3.2.5. Efeito do FAD na estabilidade térmica da ETFβ-p.D128N

O efeito na estabilidade térmica da ETFβ-p.D128N pelo FAD foi analisado para se tentar perceber a magnitude do seu efeito na recuperação do defeito conformacional encontrado na ETFβ-p.D128N e, consequentemente perceber se a percentagem de proteína particionada pode ser ou não superior à encontrada na presença de FAD. Este efeito foi estudado empregando a técnica de DSF anteriormente usada para as ACDH. Resumidamente, fez-se um *screen* do efeito do FAD medindo-se a temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) em função do aumento da concentração (10-40  $\mu$ M). Antes de qualquer adição de FAD foi verificada a razão de FAD/mol de proteína, a qual foi superior a 0.9. Os resultados obtidos mostraram que o FAD não tem um efeito estabilizador para as concentrações testadas (tabela A10 em anexo), nem mesmo para a concentração mais elevada (40  $\mu$ M) que corresponde a 20 x mais FAD em relação à quantidade de proteína (2  $\mu$ M) (figura 3.11). Estes estudos foram realizados com n=4 para cada uma das concentrações testadas (10, 20 e 40  $\mu$ M). De acordo com os resultados

obtidos sugere-se que o FAD não conduz a alterações conformacionais que melhorem a estabilidade da proteína quando submetida a uma desnaturação térmica de 20 a 90 °C. Contudo, na figura 3.11 observa-se que a ETF $\beta$ -p.D128N na presença de FAD (10-40  $\mu$ M) se encontra mais estável até uma temperatura de ~45°C visto não se observar um aumento na intensidade de fluorescência, a qual resultaria do aumento do nível de fluorescência da Sypro Orange quando ligada a regiões hidrofóbicas. Comprovasse assim o efeito estabilizador do FAD para a temperatura usada nos ensaios de partição (35°C) e que esse efeito não conduz a alterações na estabilidade conformacional da proteína dado o  $\Delta T_m$  variar dentro do erro, de 0.5-1.0.



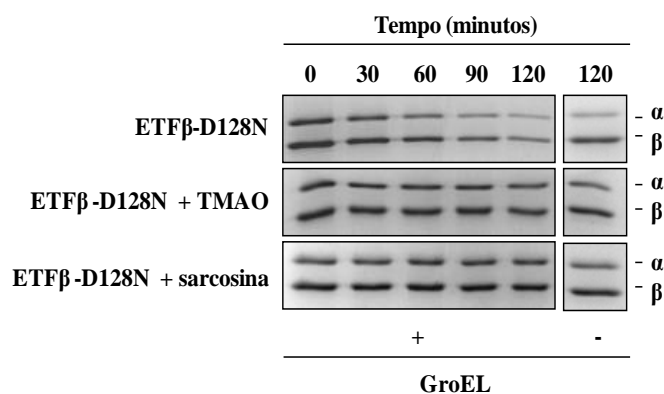
**Figura 3.11 - Curvas de desnatuação térmica determinadas por DSF.** Desnatuação térmica da variante ETF $\beta$ -p.D128N na presença de diferentes concentrações de FAD. A concentração de proteína foi de 2  $\mu$ M em 10 mM de hepes a pH 7.8. Ver tabela A10 em anexo para detalhe.

### 3.2.6. Efeito de pequenas moléculas na estabilidade térmica e partição da ETF $\beta$ -p.D128N

Adicionalmente fizeram-se ensaios de estabilidade na presença de outros compostos, conhecidos por terem a capacidade de exercerem um efeito estabilizador em certas proteínas [32-35, 101]. Estes estudos foram realizados com recurso à técnica de DSF a qual permite analisar um grande número de condições em apenas 1h. Assim, foram testados diferentes compostos a diferentes concentrações (tabela A11 em anexo). Entre os compostos testados, os que apresentaram um efeito estabilizador mais significativo foram a Trimetilamina N-óxido (TMAO) e a sarcosina com um  $\Delta T_m$ , respectivamente de ~7 e ~5 para a concentração de 1 M. De forma a se verificar se esse efeito significativo em termos de estabilidade se traduziria numa recuperação do *folding* da proteína, permitindo



que esta não fosse particionada pela GroEL, foram realizados ensaios de partição pela GroEL da mesma forma que os realizados anteriormente na presença de TMAO e sarcosina. Os resultados obtidos (figura 3.12) mostram um decréscimo na intensidade das bandas na ausência de composto. Na presença de composto isso não se verifica, indicando que a proteína na presença destes compostos não é particionada. Isto sugere que estes compostos conduzem a alterações conformacionais capazes de reverter o defeito encontrado na ETF $\beta$ -p.D128N nas condições usadas neste estudo. A precipitação da ETF $\beta$ -p.D128N também foi testada, observando-se também uma menor precipitação (figura 3.12 na ausência de GroEL) na presença dos compostos, resultante da estabilização da proteína por estes. Em suma, a combinação destas duas técnicas para tentativa de recuperação de proteínas com defeitos no *folding*, mostraram resultados concordantes. O efeito estabilizador substancial do TMAO e sarcosina determinado pela técnica de DSF revelou um substancial efeito nos ensaios de partição na GroEL impedindo a partição nesta (figura 3.12). Quanto à ausência de efeito do cofactor FAD na estabilidade térmica da proteína, este resultou na partição da proteína na GroEL indicando que a estabilização por parte do FAD à temperatura de 35°C não é suficiente para reverter o defeito no *fold* da ETF $\beta$ -p.D128N embora permita prevenir a sua precipitação e desnaturação. Esta prevenção de precipitação e desnaturação deve-se possivelmente a um desvio do equilíbrio entre o cofactor ligado e não ligado, na direcção que favorece a sua ligação, traduzindo-se na manutenção do estado nativo. A combinação destas técnicas permite assim estudar e perceber, de forma mais detalhada, o efeito conformacional dos compostos na recuperação dos defeitos no *folding* e como esse efeito influencia o nível de partição na GroEL indicando ser uma boa estratégia de estudo.



**Figura 3.12 - Efeito dos osmólitos TMAO e sarcosina na partição da ETF $\beta$ -p.D128N na GroEL quando submetido a uma temperatura moderada de 37°C.** O nível de partição pela GroEL durante 120 minutos a 37°C foi analisado por SDS-PAGE. Amostras independentes foram incubadas em 10 mM de hepes na ausência e presença de GroEL. A concentração de proteína e GroEL foram respectivamente 2 e 4  $\mu$ M. A concentração de TMAO e sarcosina usada no ensaio foi de 1 M.



#### IV. CONCLUSÃO

Este estudo teve dois objectivos principais: 1) a investigação do efeito de cofactores e metabolitos mitocondriais como potenciais estabilizadores de três acil-CoA desidrogenases: SCAD, MCAD e GCD; e 2) a investigação do efeito da chaperonina GroEL como potencial capturador da forma *misfolded* da ETF, a ETF $\beta$ -p.D128N.

O objectivo 1) teve como base o princípio de que os ligandos e substratos que aumentam a estabilidade e função proteica poderiam, em teoria, ser usados como chaperões farmacológicos para estabilização de proteínas afectadas, de forma a permitirem que estas atinjam o limite mínimo de actividade requerida para recuperação da função de proteínas associadas a patologias metabólicas. Foi investigada a hipótese de que os metabolitos e cofactores a concentrações fisiológicas da ordem dos micromolar poderiam ter este papel. Para tal tomaram-se duas abordagens complementares: por um lado testou-se o efeito na estabilidade da proteína, e por outro a estabilidade cinética sob condições de simulação de episódios de febre.

Os resultados mostraram que para a SCAD e MCAD, os substratos preferidos e o cofactor FAD têm um efeito estabilizador substancial, aumentando a estabilidade térmica da proteína e prevenindo a perda de actividade durante stress térmico moderado. Em relação aos resultados obtidos para a proteína GCD, a ligação do substrato não parece estar acoplada com a estabilização do *fold* da proteína ao contrário do cofactor FAD que claramente está. Isto sugere que a ligação do substrato à proteína GCD pode resultar, de alguma maneira, em alterações conformacionais diferentes das que ocorrem na SCAD e MCAD, as quais não conduzem a uma estabilização da estrutura da proteína GCD e reflectem diferenças entre as propriedades dinâmicas destas enzimas. O facto de o substancial efeito dos substratos preferidos para a SCAD e MCAD ocorrer na presença de concentrações próximas das fisiológicas, sugere que a manutenção do centro activo ocupado pelo substrato é uma estratégia de estabilização para estas proteínas. O efeito sinérgico do cofactor e do substrato na recuperação da estabilidade e actividade catalítica da SCAD estabelece claramente o princípio de que os cofactores e metabolitos a níveis fisiológicos são potenciais estabilizadores das acil-CoA desidrogenases. É interessante notar que nos pacientes da SCADD existe uma acumulação nas células, sangue e urina de compostos nos quais o butiril-CoA é convertido tais como o ácido etilmalónico (EMA) nas células [55]. Portanto, os pacientes poderão potencialmente beneficiar de um

tratamento que aumente os níveis intra-mitocondriais de butiril-CoA ou através de um análogo do substrato o qual teria a capacidade de estabilizar a enzima. Assim, sugere-se que o desenvolvimento de tais análogos seria um benefício potencial para estes pacientes.

O elevado efeito estabilizador do FAD observado nestes estudos é sugestivo de um efeito directo nas proteínas, o que corrobora o seu potencial benefício para os pacientes que sofrem de deficiências hereditárias nas acil-CoA desidrogenases quando submetidos a uma dieta de altas doses do precursor riboflavina, o qual conduz a um aumento intracelular dos níveis de FAD [99]. Apesar da escassez dos estudos abrangentes dos efeitos clínicos do tratamento com altas doses de riboflavina e os dados de um subgrupo de pacientes com deficiência na SCAD não serem conclusivos em relação às melhorias clínicas, sendo necessários estudos mais completos [102]. Todavia as melhorias bioquímicas resultantes de um aumento dos níveis de FAD, como resultado da terapia com vitamina B2 (riboflavina) estão bem estabelecidas e apontam para um papel essencial do cofactor FAD. Mesmo razões FAD:proteína baixas melhoram substancialmente a estabilidade proteica e sustentam a actividade enzimática. Estes estudos sugerem que a dissociação do cofactor durante o stress térmico possa ser compensada por FAD exógeno, o qual pode ser fornecido pelo tratamento com riboflavina [99]. A relevância destas observações é que uma estabilização significativa é atingida para concentrações de FAD de 20  $\mu$ M, as quais estão próximas das encontradas em condições fisiológicas da célula [98]. Esta estabilização surge provavelmente a partir de um desvio do equilíbrio entre cofactor ligado e não ligado, na direcção que favorece a sua ligação resultando numa melhoria da estabilidade da proteína. É importante notar que as experiências foram realizadas com uma ocupação das proteínas pela flavina de 0,9, portanto esta estabilização externa do FAD ocorre na holoproteína, contrariamente à estabilização bem descrita pelos cofactores das proteínas na forma apo. Este estudo possibilitou uma medida quantitativa para a estabilização das ACDH mitocondriais pelo cofactor FAD, através da saturação do sítio de ligação deste, fornecendo uma explicação para o facto de ACDH serem rapidamente degradadas em condições de depleção de FAD [103]. Adicionalmente, os resultados obtidos para o FAD levam à especulação de que o FAD possa ser um regulador geral da  $\beta$ -oxidação. Caso esta especulação seja verdadeira, o aumento dos níveis de FAD induziriam o aumento dos níveis das enzimas da  $\beta$ -oxidação uma vez que aumentariam a estabilidade proteica, podendo levar à inibição da degradação mediada pelas proteases. Em sumário, no geral estes resultados

ilustram o princípio da estabilização cinética pela ligação do substrato ao centro activo da proteína contribuindo para a estabilização da conformação da proteína, a qual resulta numa elevada actividade residual no final de 1h a 40°C. Sugerem também que a riboflavina pode ser benéfica durante crises de febre em pacientes com deficiências nas acil-CoA desidrogenases de cadeia curta (SCAD), média (MCAD), bem como na glutaril-CoA desidrogenase (GCD).

O objectivo 2) teve como base o conhecimento da potencial capacidade na chaperonina GroEL para capturar formas *misfolded* que poderão ser posteriormente recuperadas. Para tal foram efectuados estudos de partição pela chaperonina GroEL imobilizada de uma variante mutada da ETF, a ETF $\beta$ -p.D128N, a qual está associada à doença metabólica. Os resultados de partição da ETF $\beta$ -p.D128N na GroEL na presença de FAD mostraram que ~35% da proteína no final de 160 minutos a 35°C é particionada na GroEL e que o FAD previne a precipitação. Estes resultados sugerem que o FAD tem um papel na estabilização da proteína permitindo uma diminuição da desnaturação e prevenção na precipitação, não impedindo contudo, que a proteína seja particionada pela GroEL. No entanto, ressalva-se que a partição na ausência de FAD possa ser superior à percentagem de proteína particionada encontrada. A partição observada na presença de FAD permite sugerir que as variantes conformacionais podem ser recuperadas na presença de chaperões moleculares, suscitando a possibilidade deste papel pela homóloga mHsp60 presente nas mitocôndrias.

Adicionalmente foi investigada a hipótese de que os chaperões químicos poderiam ter um efeito estabilizador na ETF $\beta$ -p.D128N. Para tal, tiveram-se duas abordagens complementares: por um lado testou-se o efeito de diferentes compostos na estabilidade da proteína, e por outro, o nível de partição da proteína na GroEL na presença desses compostos. A combinação destas duas abordagens na tentativa de recuperação de proteínas com defeitos no *folding* mostrou serem concordantes. O efeito substancial dos dois compostos que mostraram um substancial efeito na estabilidade da proteína, o TMAO e a sarcosina, revelaram também um substancial efeito na conformação da proteína pelos ensaios de partição na GroEL, impedindo a partição da ETF $\beta$ -p.D128N. Quanto à ausência de efeito do cofactor FAD na estabilidade térmica da proteína dá-nos indicação que há apenas um efeito parcial na conformação da proteína, que permite prevenir a precipitação desta quando submetida a 35°C durante 160 minutos, mas que não é suficiente para impedir a partição desta na GroEL. A estabilização pelo FAD à temperatura de 35°C não parece ser suficiente para reverter o defeito no *fold* da ETF $\beta$ -p.D128N. Em sumário a combinação destas

duas abordagens permitem assim estudar e perceber, de forma mais detalhada, o efeito conformacional dos compostos na recuperação dos defeitos no *folding* visto mostrar reflectir-se no nível de partição na GroEL.

## BIBLIOGRAFIA

1. Vabulas, R.M., et al., *Protein Folding in the Cytoplasm and the Heat Shock Response*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010. **2**(12).
2. Van Drie, J.H., *Protein folding, protein homeostasis, and cancer*. Chin J Cancer, 2011. **30**(2): p. 124-37.
3. Gregersen, N., et al., *Protein Misfolding and Human Disease*. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2006. **7**(1): p. 103-124.
4. Bross, P. and N. Gregersen, *Methods in Molecular Biology - Protein Misfolding and Disease: Principles and Protocols*. Vol. 232. 2003: Humana Press Inc.
5. Anfinsen, C.B., *Principles that govern the folding of protein chains*. Science, 1973. **181**: p. 223-230.
6. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(6): p. 574-581.
7. Levinthal, C., *Are there pathways for protein folding?* J. Chim. Phys., 1968. **85**: p. 44-45.
8. Bryngelson, J.D., et al., *Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 1995. **21**(3): p. 167-195.
9. Dill, K.A. and H.S. Chan, *From Levinthal to pathways to funnels*. Nat Struct Mol Biol, 1997. **4**(1): p. 10-19.
10. van den Berg, B., R.J. Ellis, and C.M. Dobson, *Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation*. EMBO J, 1999. **18**(24): p. 6927-6933.
11. van den Berg, B., et al., *Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: implications for folding inside the cell*. EMBO J, 2000. **19**(15): p. 3870-3875.
12. Kramer, G., et al., *The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins*. Nature Structural & Molecular Biology, 2009. **16**(6): p. 589-597.
13. Chang, H.C., et al., *SnapShot: molecular chaperones, Part I*. Cell 2007. **128**(1): p. 212.
14. Tang, Y.C., et al., *SnapShot: molecular chaperones, Part II*. Cell, 2007. **128**(2): p. 412.
15. Peng, L., et al., *A Chaperonin Subunit with Unique Structures Is Essential for Folding of a Specific Substrate*. PLoS Biol, 2011. **9**(4): p. e1001040.
16. Chennubhotla, C. and I. Bahar, *Markov propagation of allosteric effects in biomolecular systems: application to GroEL-GroES*. Mol Syst Biol, 2006. **2**.
17. Golbik, R., et al., *Thermodynamic stability and folding of GroEL minichaperones*. Journal of Molecular Biology, 1998. **276**(2): p. 505-515.
18. Li, Y., et al., *Analysis of peptides and proteins in their binding to GroEL*. Journal of Peptide Science, 2010. **16**(12): p. 693-700.
19. Chaudhuri, T.K., et al., *GroEL/GroES-Mediated Folding of a Protein Too Large to Be Encapsulated*. Cell, 2001. **107**(2): p. 235-246.
20. Wickner, S., et al., *A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 12218-12222.
21. Chiti, F. and C.M. Dobson, *Protein misfolding, functional amyloid, and human disease*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 333-366.
22. Gregersen, N., et al., *Mitochondrial fatty acid oxidation defects—remaining challenges*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2008. **31**(5): p. 643-657.

23. Lim, J., et al., *Opposing effects of polyglutamine expansion on native protein complexes contribute to SCA1*. *Nature*, 2008. **452**(7188): p. 713-718.
24. Naik, S., et al., *Identifying protein stabilizing ligands using GroEL*. *Biopolymers*, 2010. **93**(3): p. 237-251.
25. Kolter, T. and M. Wendeler, *Chemical chaperones--a new concept in drug research*. *Chembiochem*, 2003. **4**(4): p. 260-264.
26. Loo, T.W. and D.M. Clarke, *Chemical and pharmacological chaperones as new therapeutic agents*. *Expert Rev Mol Med*, 2007. **9**(16): p. 1-18.
27. Leandro, P. and C.M. Gomes, *Protein misfolding in conformational disorders: rescue of folding defects and chemical chaperoning*. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2008. **8**(9): p. 901-911.
28. Timasheff, S.N., *Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration*. *Biochemistry*, 2002. **41**(46): p. 13473-13482.
29. Timasheff, S.N., *Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(15): p. 9721-9726.
30. Yancey, P.H., *Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses*. *J Exp Biol*, 2005. **208**(Pt 15): p. 2819-2830.
31. Diamant, S., et al., *Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(43): p. 39586-39591.
32. Van Goor, F., et al., *Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006. **290**(6): p. 1117-1130.
33. Leandro, P., et al., *Glycerol increases the yield and activity of human phenylalanine hydroxylase mutant enzymes produced in a prokaryotic expression system*. *Mol Genet Metab*, 2001. **73**(2): p. 173-178.
34. Tanaka, M., Y. Machida, and N. Nukina, *A novel therapeutic strategy for polyglutamine diseases by stabilizing aggregation-prone proteins with small molecules*. *J Mol Med* 2005. **83**(5): p. 343-352.
35. Sawkar, A.R., et al., *Chemical chaperones and permissive temperatures alter localization of Gaucher disease associated glucocerebrosidase variants*. *ACS Chem Biol*, 2006. **1**(4): p. 235-251.
36. Voziyan, P., et al., *Designing a High Throughput Refolding Array Using a Combination of the GroEL Chaperonin and Osmolytes*. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 2005. **6**(2): p. 183-188.
37. Eaton, S., *Control of mitochondrial [beta]-oxidation flux*. *Progress in Lipid Research*, 2002. **41**(3): p. 197-239.
38. Rocha, H., et al., *Characterization of mitochondrial proteome in a severe case of ETF-QO deficiency*. *Journal of Proteomics*, 2011. **In Press, Corrected Proof**.
39. Kompare, M. and W.B. Rizzo, *Mitochondrial Fatty-Acid Oxidation Disorders*. *Seminars in Pediatric Neurology*, 2008. **15**(3): p. 140-149.
40. Houten, S. and R. Wanders, *A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation*. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2010. **33**(5): p. 469-477.
41. Moczulski, D., et al., *An overview of beta-oxidation disorders*. *Postepy Hig Med Dosw*, 2009. **63**: p. 266-77.
42. Rinaldo, P., D. Matern, and M.J. Bennett, *FATTY ACID OXIDATION DISORDERS*. *Annual Review of Physiology*, 2002. **64**(1): p. 477-502.



43. Henriques, B.J., *Defective protein folding and function in metabolic disorders - Studies on the mitochondrial flavoenzyme ETF* in Instituto de Tecnologia Química e Biológica 2010, Universidade Nova de Lisboa: Oeiras. p. 1-181.
44. Kim, J.J. and R. Miura, *Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases. Structural basis for mechanistic similarities and differences*. Eur J Biochem, 2004. **271**(3): p. 483-493.
45. Ghisla, S. and C. Thorpe, *Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview*. Eur J Biochem, 2004. **271**(3): p. 494-508.
46. Roberts, D.L., F.E. Frerman, and J.J. Kim, *Three-dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1-Å resolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14355-14360.
47. Zhang, J., F.E. Frerman, and J.J. Kim, *Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(44): p. 16212-16217.
48. Maier, E.M., et al., *Population spectrum of ACADM genotypes correlated to biochemical phenotypes in newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*. Hum Mutat, 2005. **25**(5): p. 443-452.
49. Hoffmann, G.F., et al., *Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany*. 163, 2004. **2**(76-80).
50. Kim, J.J., M. Wang, and R. Paschke, *Crystal structures of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria with and without substrate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(16): p. 7523-7527.
51. Ikeda, Y., et al., *Biosynthesis of four rat liver mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases: in vitro synthesis, import into mitochondria, and processing of their precursors in a cell-free system and in cultured cells*. Arch Biochem Biophys, 1987. **252**(2): p. 662-674.
52. Lee, H.J., et al., *Crystal structures of the wild type and the Glu376Gly/Thr255Glu mutant of human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase: influence of the location of the catalytic base on substrate specificity*. Biochemistry, 1996. **35**(38): p. 12412-12420.
53. Izai, K., et al., *Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase*. J Biol Chem, 1992. **267**(2): p. 1027-1033.
54. Gregersen, N., P. Bross, and B.S. Andresen, *Genetic defects in fatty acid beta-oxidation and acyl-CoA dehydrogenases. Molecular pathogenesis and genotype-phenotype relationships*. Eur J Biochem, 2004. **271**(3): p. 470-482.
55. Jethva, R., M.J. Bennett, and J. Vockley, *Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency*. Mol Genet Metab, 2008. **95**(4): p. 195-200.
56. Corydon, M.J., et al., *Structural organization of the human short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene*. Mamm Genome, 1997. **8**(12): p. 922-926.
57. Naito, E., et al., *Molecular cloning and nucleotide sequence of complementary DNAs encoding human short chain acyl-coenzyme A dehydrogenase and the study of the molecular basis of human short chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency*. J Clin Invest, 1989. **83**(5): p. 1605-1613.
58. Nguyen, T.V., et al., *Purification and characterization of two polymorphic variants of short chain acyl-CoA dehydrogenase reveal reduction of catalytic activity and stability of the Gly185Ser enzyme*. Biochemistry, 2002. **41**(37): p. 11126-33.

59. van Maldegem, B.T., et al., *Clinical, biochemical, and genetic heterogeneity in short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency*. JAMA, 2006. **296**(8): p. 943-52.
60. Kölker, S., et al., *Diagnosis and management of glutaric aciduria type I – revised recommendations*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2011. **34**(3): p. 677-694.
61. Keyser, B., et al., *Disease-causing missense mutations affect enzymatic activity, stability and oligomerization of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH)*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(24): p. 3854-3863.
62. Hedlund, G.L., N. Longo, and M. Pasquali, *Glutaric acidemia type 1*. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics, 2006. **142C**(2): p. 86-94.
63. Schiff, M., et al., *Electron transfer flavoprotein deficiency: Functional and molecular aspects*. Molecular Genetics and Metabolism, 2006. **88**(2): p. 153-158.
64. Olsen, R.K.J., et al., *ETFDH mutations as a major cause of riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency*. Brain, 2007. **130**(8): p. 2045-2054.
65. Law, L.-K., et al., *Novel mutations in ETFDH gene in Chinese patients with riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency*. Clinica Chimica Acta, 2009. **404**(2): p. 95-99.
66. Shevell, M.I., et al., *Glutaric acidemia type II: Neuroimaging and spectroscopy evidence for developmental encephalomyopathy*. Pediatric neurology, 1995. **12**(4): p. 350-353.
67. Henriques, B.J., et al., *Role of Flavinylation in a Mild Variant of Multiple Acyl-CoA Dehydrogenation Deficiency*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(7): p. 4222-4229.
68. Olsen, R.K.J., et al., *Clear relationship between ETF/ETFDH genotype and phenotype in patients with multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency*. Human Mutation, 2003. **22**(1): p. 12-23.
69. Hoard, H.M., et al., *Microelectrospray Ionization Analysis of Noncovalent Interactions within the Electron Transferring Flavoprotein*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **282**(1): p. 297-305.
70. Henriques, B.J., et al., *A polymorphic position in electron transfer flavoprotein modulates kinetic stability as evidenced by thermal stress*. FEBS Letters, 2011. **585**(3): p. 505-510.
71. Toogood, H.S., et al., *Extensive domain motion and electron transfer in the human electron transferring flavoprotein.medium chain Acyl-CoA dehydrogenase complex*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32904-32912.
72. Curcoy, A., et al., *Late-onset form of beta-electron transfer flavoprotein deficiency*. Mol Genet Metab, 2003. **78**(4): p. 247-249.
73. Freneaux, E., et al., *Glutaric acidemia type II. Heterogeneity in beta-oxidation flux, polypeptide synthesis, and complementary DNA mutations in the alpha subunit of electron transfer flavoprotein in eight patients*. J Clin Invest, 1992. **90**(5): p. 1679-1686.
74. Henriques, B.J., P. Bross, and C.M. Gomes, *Mutational hotspots in electron transfer flavoprotein underlie defective folding and function in multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2010. **1802**(11): p. 1070-1077.
75. Spector, E.B., W.K. Seltzer, and S.I. Goodman, *Assignment of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase (ETF-QO) to human chromosome 4q33*

- by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybridization. *Mol Genet Metab*, 1999. **67**(4): p. 364-367.
76. Er, T.-K., et al., *High resolution melting analysis facilitates mutation screening of ETFDH gene: Applications in riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency*. *Clinica Chimica Acta*, 2010. **411**(9-10): p. 690-699.
77. Dill, K.A., et al., *The Protein Folding Problem*. *Annual Review of Biophysics*, 2008. **37**(1): p. 289-316.
78. Niesen, F.H., H. Berglund, and M. Vedadi, *The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability*. *Nat. Protocols*, 2007. **2**(9): p. 2212-2221.
79. Ericsson, U.B., et al., *Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies*. *Analytical Biochemistry*, 2006. **357**(2): p. 289-298.
80. Senisterra, G.A. and J.P.J. Finerty, *High throughput methods of assessing protein stability and aggregation*. *Molecular BioSystems*, 2009. **5**(3): p. 217-223.
81. Hawe, A., M. Sutter, and W. Jiskoot, *Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization*. *Pharmaceutical Research*, 2008. **25**(7): p. 1487-1499.
82. Jones, C.M., *An Introduction to Research in Protein Folding for Undergraduates*. *Journal of Chemical Education*, 1997. **74**(11): p. 1306-1310.
83. Shirley, B.A., *Methods in Molecular Biology - Protein Stability and Folding: Theory and practice*. Vol. 40. 1995: Humana Press Inc.
84. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2<sup>th</sup> ed1999: Plenum Press.
85. Albani, J.R., *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. 5<sup>th</sup> ed2007: Blackwell Publishing.
86. Greenfield, N.J., *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*. *Nat. Protocols*, 2007. **1**(6): p. 2876-2890.
87. Atkins, P. and J. de Paula, *Elements of Physical Chemistry*. 4<sup>th</sup> ed2005: Oxford University Press.
88. Ranjbar, B. and P. Gill, *Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review*. *Chemical Biology & Drug Design*, 2009. **74**(2): p. 101-120.
89. Fabian, H. and D. Naumann, *Methods to study protein folding by stopped-flow FT-IR*. *Methods*, 2004. **34**(1): p. 28-40.
90. Balakrishnan, G., et al., *Protein dynamics from time resolved UV Raman spectroscopy*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2008. **18**(5): p. 623-629.
91. Dyson, H.J. and P.E. Wright, *Elucidation of the protein folding landscape by NMR*. *Métodos Enzymol*, 2005. **394**: p. 299-321.
92. Corydon, T.J., et al., *Rapid Degradation of Short-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Variants with Temperature-sensitive Folding Defects Occurs after Import into Mitochondria*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(21): p. 13065-13071.
93. Bross, P., et al., *Effects of two mutations detected in medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)-deficient patients on folding, oligomer assembly, and stability of MCAD enzyme*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(17): p. 10284-10290.
94. Rhead, W., et al., *Multiple acyl-coenzyme A dehydrogenation disorder responsive to riboflavin: substrate oxidation, flavin metabolism, and flavoenzyme activities in fibroblasts*. *Pediatr Res*, 1993. **33**(2): p. 129-135.
95. McKean, M.C., J.D. Beckmann, and F.E. Frerman, *Subunit structure of electron transfer flavoprotein*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(3): p. 1866-1870.

96. Lewis, J.A. and J.C. Escalante-Semerena, *The FAD-dependent tricarballoylate dehydrogenase (TcuA) enzyme of Salmonella enterica converts tricarballoylate into cis-aconitate*. J Bacteriol, 2006. **188**(15): p. 5479-86.
97. Thorpe, C., R.G. Matthews, and C.H. Williams Jr., *Acyl-coenzyme A dehydrogenase from pig kidney. Purification and properties*. Biochemistry, 1979. **18**(2): p. 331-337.
98. Bennett, B.D., et al., *Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in Escherichia coli*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(8): p. 593-599.
99. Gianazza, E., et al., *Coordinated and reversible reduction of enzymes involved in terminal oxidative metabolism in skeletal muscle mitochondria from a riboflavin-responsive, multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency patient*. ELECTROPHORESIS, 2006. **27**(5-6): p. 1182-1198.
100. Correia, A.R., et al., *Iron-binding activity in yeast frataxin entails a trade off with stability in the alpha1/beta1 acidic ridge region*. Biochem J, 2010. **426**(2): p. 197-203.
101. Song, J.L. and D.T. Chuang, *Natural osmolyte trimethylamine N-oxide corrects assembly defects of mutant branched-chain alpha-ketoacid decarboxylase in maple syrup urine disease*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40241-40246.
102. van Maldegem, B.T., et al., *Flavin adenine dinucleotide status and the effects of high-dose riboflavin treatment in short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*. Pediatr Res, 2010. **67**(3): p. 304-308.
103. Nagao, M. and K. Tanaka, *FAD-dependent regulation of transcription, translation, post-translational processing, and post-processing stability of various mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases and of electron transfer flavoprotein and the site of holoenzyme formation*. J Biol Chem, 1992. **267**(25): p. 17925-17932.

## **ANEXO 1**



**Tabela A1 – Temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) para a SCAD, MCAD e GCD determinada por DSF.** As curvas de desnaturação foram traçadas na ausência (controle) e presença de concentrações graduais de diferentes compostos e substratos. O  $\Delta T_m$  representa a variação comparada com o controle. A concentração de proteína foi de 1,2  $\mu$ M em 10 mM de hepes a pH 7,8.

|                      | Concentração ( $\mu$ M) | SCAD  |              | MCAD  |              | GCD   |              |
|----------------------|-------------------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|
|                      |                         | $T_m$ | $\Delta T_m$ | $T_m$ | $\Delta T_m$ | $T_m$ | $\Delta T_m$ |
| <b>Controle</b>      | -                       | 50,0  | -            | 54,0  | -            | 54,0  | -            |
| <b>Butiril-CoA</b>   | 0,16                    | -     | -            | 55,0  | 1,0          | 54,5  | 0,5          |
|                      | 0,8                     | 56,0  | 6,0          | 55,0  | 1,0          | 54,5  | 0,5          |
|                      | 4                       | 59,0  | 9,0          | 56,0  | 2,0          | 54,5  | 0,5          |
|                      | 20                      | 62,0  | 12,0         | 56,0  | 2,0          | 54,5  | 0,5          |
|                      | 100                     | 63,0  | 13,0         | 58,0  | 4,0          | 53,5  | -0,5         |
| <b>Octanoil-CoA</b>  | 0,16                    | -     | -            | 56,0  | 2,0          | 53,5  | -0,5         |
|                      | 0,8                     | 51,0  | 1,0          | 58,0  | 4,0          | 54,5  | 0,5          |
|                      | 4                       | 52,0  | 2,0          | 62,0  | 8,0          | 53,5  | -0,5         |
|                      | 20                      | 54,0  | 4,0          | 64,0  | 10,0         | 54,5  | 0,5          |
|                      | 100                     | 55,0  | 5,0          | 67,0  | 13,0         | 52,5  | -1,5         |
| <b>Glutaril-CoA</b>  | 0,16                    | -     | -            | 55,0  | 1,0          | 54,5  | 0,5          |
|                      | 0,8                     | 51,0  | 1,0          | 54,0  | 0,0          | 53,5  | -0,5         |
|                      | 4                       | 51,0  | 1,0          | 55,0  | 1,0          | 53,5  | -0,5         |
|                      | 20                      | 52,0  | 2,0          | 55,0  | 1,0          | 54,5  | 0,5          |
|                      | 100                     | 54,0  | 4,0          | 56,0  | 2,0          | 54,5  | 0,5          |
| <b>Palmitoil-CoA</b> | 0,16                    | 51,0  | 1,0          | 55,0  | 1,0          | 54,5  | 0,5          |
|                      | 0,8                     | 53,0  | 3,0          | 55,0  | 1,0          | 54,5  | 0,5          |
|                      | 4                       | 55,0  | 5,0          | 55,0  | 1,0          | 54,5  | 0,5          |
|                      | 20                      | 54,0  | 4,0          | 54,0  | 0,0          | 54,5  | 0,5          |
|                      | 100                     | 53,0  | 3,0          | 55,0  | 1,0          | 53,5  | -0,5         |
| <b>Acetil-CoA</b>    | 0,16                    | 51,0  | 1,0          | 55,0  | 1,0          | 55,5  | 1,5          |
|                      | 0,8                     | 51,0  | 1,0          | 55,0  | 1,0          | 53,5  | -0,5         |
|                      | 4                       | 51,0  | 1,0          | 55,0  | 1,0          | 53,5  | -0,5         |
|                      | 20                      | 52,0  | 2,0          | 55,0  | 1,0          | 52,5  | -1,5         |
|                      | 100                     | 54,0  | 4,0          | 56,0  | 2,0          | 53,5  | -0,5         |
| <b>CoA</b>           | 0,16                    | -     | -            | 55,0  | 1,0          | 53,5  | -0,5         |
|                      | 0,8                     | 51,0  | 1,0          | -     | -            | 54,5  | 0,5          |
|                      | 4                       | 51,0  | 1,0          | 56,0  | 2,0          | 54,5  | 0,5          |
|                      | 20                      | 53,0  | 3,0          | 56,0  | 2,0          | 53,5  | -0,5         |
|                      | 100                     | 54,0  | 4,0          | 55,0  | 1,0          | 50,5  | -3,5         |

**Tabela A2 – Temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) determinada a partir das experiências de DSF para a SCAD, MCAD e GCD na presença de concentrações graduais de FAD e riboflavina.** O  $\Delta T_m$  representa a variação em relação ao controle (ver tabela A1). A concentração de proteína foi de 1,2  $\mu$ M em 10 mM de hepes a pH 7,8.

|      | Concentração ( $\mu$ M) | Riboflavina |              | FAD   |              |
|------|-------------------------|-------------|--------------|-------|--------------|
|      |                         | $T_m$       | $\Delta T_m$ | $T_m$ | $\Delta T_m$ |
| SCAD | 3,1                     | 48,5        | -1,5         | 54,0  | 4,0          |
|      | 6,3                     | 50,5        | 0,5          | 55,0  | 5,0          |
|      | 12,5                    | 50,5        | 0,5          | 57,0  | 7,0          |
|      | 20,0                    | 51,5        | 1,5          | 60,0  | 10,0         |
|      | 25,0                    | 51,5        | 1,5          | 62,0  | 12,0         |
| MCAD | 3,1                     | 55,0        | 1,0          | 60,0  | 6,0          |
|      | 6,3                     | 55,0        | 1,0          | 61,0  | 7,0          |
|      | 12,5                    | 55,0        | 1,0          | 63,0  | 9,0          |
|      | 20,0                    | 54,0        | 0,0          | 63,0  | 9,0          |
|      | 25,0                    | 55,0        | 1,0          | 64,0  | 10,0         |
| GCD  | 3,1                     | 55,5        | 1,5          | 61,5  | 7,5          |
|      | 6,3                     | 53,5        | -0,5         | 62,5  | 8,5          |
|      | 12,5                    | 52,5        | -1,5         | 64,5  | 10,5         |
|      | 20,0                    | 53,5        | -0,5         | 65,5  | 11,5         |
|      | 25,0                    | 52,5        | -1,5         | 66,5  | 12,5         |

**Tabela A3 – Temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) determinada por DSF para a SCAD na presença de diferentes compostos.** A concentração de proteína e composto foi, respectivamente, 1,2  $\mu$ M e 20 $\mu$ M. O  $\Delta T_m$  representa a variação em relação ao controle sem a adição de qualquer composto (ver tabela A1).

|      | Compostos     | - FAD          |                    | + FAD          |                    |
|------|---------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|
|      |               | $T_m$ (n=3)    | $\Delta T_m$ (n=3) | $T_m$ (n=3)    | $\Delta T_m$ (n=3) |
| SCAD | FAD           | -              | -                  | 58,0 $\pm$ 0,0 | 8,0 $\pm$ 0,0      |
|      | CoA           | 51,0 $\pm$ 0,0 | 1,0 $\pm$ 0,0      | 58,3 $\pm$ 0,6 | 8,3 $\pm$ 0,6      |
|      | Acetil-CoA    | 51,0 $\pm$ 0,0 | 1,0 $\pm$ 0,0      | 58,0 $\pm$ 0,0 | 8,0 $\pm$ 0,0      |
|      | Butiril-CoA   | 58,7 $\pm$ 0,6 | 8,7 $\pm$ 0,6      | 63,0 $\pm$ 0,0 | 13,0 $\pm$ 0,0     |
|      | Octanoil-CoA  | 53,0 $\pm$ 0,0 | 3,0 $\pm$ 0,0      | 60,3 $\pm$ 0,6 | 10,3 $\pm$ 0,6     |
|      | Glutaril-CoA  | 51,0 $\pm$ 0,0 | 1,0 $\pm$ 0,0      | 58,7 $\pm$ 0,6 | 8,7 $\pm$ 0,6      |
|      | Palmitoil-CoA | 51,3 $\pm$ 0,6 | 1,3 $\pm$ 0,6      | 54,7 $\pm$ 0,6 | 4,7 $\pm$ 0,6      |



**Tabela A4 – Actividade residual após stress térmico (1h a 40°C) determinada para a SCAD, MCAD e GCD.** As proteínas foram incubadas a 40°C na ausência e presença de substratos (20  $\mu$ M) ou FAD (20  $\mu$ M), ou na presença de ambos. A concentração da proteína foi de 1,2  $\mu$ M em 10 mM de hepes a pH 7,8. Os valores da actividade residual foram calculados em relação à actividade ao tempo zero, para cada condição em estudo.

|      | Compostos         | Residual activity (%) (n=3) |
|------|-------------------|-----------------------------|
| SCAD | Nenhum composto   | 49 $\pm$ 9                  |
|      | FAD               | 104 $\pm$ 15                |
|      | Butiril-CoA       | 81 $\pm$ 7                  |
|      | Butiril -CoA+FAD  | 115 $\pm$ 7                 |
|      | Octanoil-CoA      | 38 $\pm$ 15                 |
|      | Octanoil -CoA+FAD | 157 $\pm$ 5                 |
|      | Glutaril-CoA      | 35 $\pm$ 10                 |
|      | Glutaril -CoA+FAD | 122 $\pm$ 14                |
| MCAD | Nenhum composto   | 31 $\pm$ 13                 |
|      | FAD               | 100 $\pm$ 8                 |
|      | Butiril-CoA       | 73 $\pm$ 2                  |
|      | Butiril -CoA+FAD  | 169 $\pm$ 10                |
|      | Octanoil-CoA      | 132 $\pm$ 10                |
|      | Octanoil -CoA+FAD | 166 $\pm$ 17                |
|      | Glutaril-CoA      | 39 $\pm$ 1                  |
|      | Glutaril -CoA+FAD | 172 $\pm$ 6                 |
| GCD  | Nenhum composto   | 48 $\pm$ 4                  |
|      | FAD               | 114 $\pm$ 7                 |
|      | Butiril-CoA       | 65 $\pm$ 3                  |
|      | Butiril -CoA+FAD  | 65 $\pm$ 3                  |
|      | Octanoil-CoA      | 47 $\pm$ 7                  |
|      | Octanoil -CoA+FAD | 69 $\pm$ 12                 |
|      | Glutaril-CoA      | 52 $\pm$ 7                  |
|      | Glutaril -CoA+FAD | 83 $\pm$ 14                 |

**Tabela A5 – Efeito da GroEL na ETF quando submetida a uma temperatura moderada de 35°C.** Análise densitométrica das bandas do SDS-PAGE para a ETF $\beta$ -p.D128N e para a ETF-WT. O ponto inicial (antes das proteínas serem incubadas) corresponde a 100%. Amostras independentes foram incubadas em 10 mM de hepes na ausência e presença de GroEL a 35°C. A concentração de proteína e GroEL foram respectivamente 2 e 4  $\mu$ M.

| Tempo (minutos) | % ETF $\beta$ -p.D128N em solução |               | % ETF-WT em solução |               |
|-----------------|-----------------------------------|---------------|---------------------|---------------|
|                 | - GroEL (n=2)                     | + GroEL (n=2) | - GroEL (n=1)       | + GroEL (n=1) |
| 0               | 100                               | 100           | 100                 | 100           |
| 40              | 85 $\pm$ 15                       | 83 $\pm$ 10   | 103                 | 92            |
| 80              | 81 $\pm$ 8                        | 75 $\pm$ 9    | 100                 | 92            |
| 120             | 62                                | 63 $\pm$ 12   | 100                 | 88            |
| 160             | 54 $\pm$ 0                        | 53 $\pm$ 18   | 82                  | 92            |

**Tabela A6 – Efeito do FAD na ETFβ-p.D128N quando submetida a uma temperatura moderada de 35°C.** Análise densitométrica das bandas do SDS-PAGE. O ponto inicial (antes das proteínas serem incubadas) corresponde a 100%. Análise da diminuição dos contactos da estrutura terciária determinada a partir da variação do comprimento de onda médio na região dos triptofanos (300-450 nm). Amostras independentes foram incubadas em 10 mM de hepes na ausência e presença de GroEL a 35°C. A concentração de proteína e FAD foram respectivamente 2 e 20 μM.

| Tempo (minutos) | % ETFβ-p.D128N em solução |             | AEW (nm)    |             |
|-----------------|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                 | - FAD (n=2)               | + FAD (n=2) | - FAD (n=2) | + FAD (n=2) |
| 0               | 100                       | 100         | 338,8 ± 1,2 | 337,3 ± 1,6 |
| 40              | 85 ± 15                   | 98          | 341,9 ± 0,7 | 338,1 ± 1,4 |
| 80              | 81 ± 8                    | 93 ± 7      | 343,4 ± 0,6 | 339,0 ± 1,6 |
| 120             | 62                        | 80          | 343,6 ± 1,1 | 339,7 ± 1,6 |
| 160             | 54                        | 79 ± 6      | 343,0 ± 1,1 | 339,9 ± 1,4 |

**Tabela A7 – Efeito da GroEL na ETFβ-p.D128N quando submetida a uma temperatura moderada de 35°C.** Análise densitométrica das bandas do SDS-PAGE. O ponto inicial (antes das proteínas serem incubadas) corresponde a 100%. Percentagem de proteína particionada pela GroEL ao longo do tempo. Amostras independentes foram incubadas em 10 mM de hepes e 20 μM de FAD, na ausência e presença de GroEL a 35 °C. A concentração de proteína, GroEL e FAD foram respectivamente 2, 4 μM.

| Tempo (minutos) | % ETFβ-p.D128N em solução |               | % ETFβ-p.D128N particionada |
|-----------------|---------------------------|---------------|-----------------------------|
|                 | - GroEL (n=2)             | + GroEL (n=2) |                             |
| 0               | 100                       | 100           | 0                           |
| 40              | 98                        | 80 ± 1        | 18 ± 1                      |
| 80              | 93 ± 7                    | 70            | 24 ± 7                      |
| 120             | 80                        | 53 ± 9        | 27 ± 10                     |
| 160             | 79 ± 6                    | 54 ± 13       | 33 ± 6                      |

**Tabela A8 – Efeito da GroEL na ETFβ-p.D128N quando submetida a uma temperatura moderada de 35°C.** Análise da diminuição dos contactos da estrutura terciária da ETFβ-p.D128N determinada a partir da variação do comprimento de onda médio na região dos triptofanos (300-450 nm). Amostras independentes foram incubadas em 10 mM de hepes na ausência e presença de GroEL a 35 °C. A concentração de proteína e GroEL foram respectivamente 2 e 4 μM.

| Tempo (minutos) | AEW (nm)     |               |
|-----------------|--------------|---------------|
|                 | - GroEL(n=2) | + GroEL (n=2) |
| 0               | 338,8 ± 1,2  | 339,2 ± 0,9   |
| 40              | 341,9 ± 0,7  | 339,7 ± 0,9   |
| 80              | 343,4 ± 0,6  | 341,0 ± 0,9   |
| 120             | 343,6 ± 1,1  | 341,7 ± 1,2   |
| 160             | 343,0 ± 1,1  | 341,9 ± 1,4   |

**Tabela A9 – Efeito da GroEL na ETF $\beta$ -p.D128N quando submetida a uma temperatura moderada de 35°C na presença e ausência de FAD.** Análise densitométrica das bandas do SDS-PAGE. O ponto inicial (antes das proteínas serem incubadas) corresponde a 100%. Análise da diminuição dos contactos da estrutura terciária determinada a partir da variação do comprimento de onda médio na região dos triptofanos (300-450 nm). Amostras independentes foram incubadas em 10 mM de hepes na ausência e presença de FAD a 35 °C. A concentração de proteína e FAD foram respectivamente 2 e 20  $\mu$ M.

| Tempo (minutos) | % ETF $\beta$ -p.D128N em solução |             | AEW (nm)        |                 |
|-----------------|-----------------------------------|-------------|-----------------|-----------------|
|                 | - FAD (n=2)                       | + FAD (n=2) | - FAD (n=2)     | + FAD (n=2)     |
| 0               | 100 $\pm$ 0                       | 100 $\pm$ 0 | 339,2 $\pm$ 0,9 | 337,6 $\pm$ 1,2 |
| 40              | 83 $\pm$ 10                       | 80 $\pm$ 1  | 339,7 $\pm$ 0,9 | 337,6 $\pm$ 1,2 |
| 80              | 75 $\pm$ 9                        | 70 $\pm$ 0  | 341,0 $\pm$ 0,9 | 338,2 $\pm$ 1,5 |
| 120             | 63 $\pm$ 12                       | 53 $\pm$ 9  | 341,7 $\pm$ 1,2 | 338,9 $\pm$ 1,6 |
| 160             | 53 $\pm$ 18                       | 54 $\pm$ 13 | 342,0 $\pm$ 1,4 | 339,5 $\pm$ 1,7 |

**Tabela A10 – Temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) para a ETF $\beta$ -p.D128N determinada por DSF.** As curvas de desnaturação foram traçadas na ausência (controlo) e presença de concentrações graduais de FAD. O  $\Delta T_m$  representa a variação comparada com o controlo. A concentração de proteína foi de 2  $\mu$ M em 10 mM de hepes a pH 7,8.

|          | Concentração ( $\mu$ M) | ETF $\beta$ -p.D128N |                    |
|----------|-------------------------|----------------------|--------------------|
|          |                         | $T_m$ (n=4)          | $\Delta T_m$ (n=4) |
| Controlo | -                       | 53,0 $\pm$ 0,0       | -                  |
| FAD      | 10                      | 53,5 $\pm$ 0,0       | 0,5 $\pm$ 0,7      |
|          | 20                      | 54 $\pm$ 0,7         | 1,0 $\pm$ 0,0      |
|          | 40                      | 54 $\pm$ 0,0         | 1,0 $\pm$ 0,0      |

**Tabela A11 – Temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) para a ETF $\beta$ -p.D128N determinada a partir das experiências de DSF.** As curvas de desnaturação foram traçadas na ausência (controle) e presença de concentrações graduais de diferentes compostos. O  $\Delta T_m$  representa a variação comparada com o controle (ver tabela A10). A concentração de proteína foi de 2  $\mu$ M em 10 mM de hepes a pH 7,8.

|                    | Concentração ( $\mu$ M) | ETF $\beta$ -D128N |                    |
|--------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|
|                    |                         | $T_m$ (n=2)        | $\Delta T_m$ (n=2) |
| <b>TMAO</b>        | 0,5                     | 57,0 $\pm$ 0,0     | 4,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 1                       | 60,0 $\pm$ 0,0     | 7,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 1,5                     | 63,0 $\pm$ 0,0     | 10,0 $\pm$ 0,0     |
| <b>Sarcosina</b>   | 0,5                     | 55,0 $\pm$ 0,0     | 2,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 1                       | 58,0 $\pm$ 0,0     | 5,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 1,5                     | 59,0 $\pm$ 0,0     | 6,0 $\pm$ 0,0      |
| <b>Glicina</b>     | 0,5                     | 55,5 $\pm$ 0,7     | 2,5 $\pm$ 0,7      |
|                    | 1                       | 57,5 $\pm$ 0,7     | 4,5 $\pm$ 0,7      |
|                    | 1,5                     | 58,5 $\pm$ 0,7     | 5,5 $\pm$ 0,7      |
| <b>Sorbitol</b>    | 0,5                     | 55,0 $\pm$ 0,0     | 2,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 1                       | 57,0 $\pm$ 0,0     | 4,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 1,5                     | 58,5 $\pm$ 0,7     | 5,5 $\pm$ 0,7      |
| <b>Prolina</b>     | 0,5                     | 54,0 $\pm$ 0,0     | 1,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 1                       | 54,0 $\pm$ 0,0     | 1,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 1,5                     | 55,0 $\pm$ 0,0     | 2,0 $\pm$ 0,0      |
| <b>Sucrose</b>     | 0,5                     | 54,0 $\pm$ 0,0     | 1,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 1                       | 57,0 $\pm$ 0,0     | 4,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 1,25                    | 56,5 $\pm$ 0,7     | 3,5 $\pm$ 0,7      |
| <b>Arginina</b>    | 0,5                     | 43,5 $\pm$ 0,7     | -9,5 $\pm$ 0,7     |
|                    | 1                       | 43,5 $\pm$ 0,7     | -9,5 $\pm$ 0,7     |
|                    | 1,5                     | 40,5 $\pm$ 2,1     | -12,5 $\pm$ 2,1    |
| <b>Glicerol</b>    | 3                       | 54,5 $\pm$ 0,7     | 1,5 $\pm$ 0,7      |
|                    | 4                       | 54,0 $\pm$ 0,0     | 1,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 5                       | 54,0 $\pm$ 0,0     | 1,0 $\pm$ 0,0      |
| <b>Trehalose</b>   | 0,25                    | 54,5 $\pm$ 0,7     | 1,5 $\pm$ 0,7      |
|                    | 0,5                     | 56,5 $\pm$ 0,7     | 3,5 $\pm$ 0,7      |
|                    | 0,75                    | 57,0 $\pm$ 0,0     | 4,0 $\pm$ 0,7      |
| <b>FMN</b>         | 5                       | 53,0 $\pm$ 0,0     | 0,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 10                      | 53,0 $\pm$ 0,0     | 0,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 20                      | 53,0 $\pm$ 0,0     | 0,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 40                      | 53,0 $\pm$ 0,0     | 0,0 $\pm$ 0,0      |
| <b>AMP</b>         | 5                       | 54,0 $\pm$ 0,0     | 1,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 10                      | 54,0 $\pm$ 0,0     | 1,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 20                      | 54,5 $\pm$ 0,7     | 1,5 $\pm$ 0,7      |
|                    | 40                      | 55,0 $\pm$ 0,0     | 2,0 $\pm$ 0,0      |
| <b>Riboflavina</b> | 5                       | 53,5 $\pm$ 0,7     | 0,5 $\pm$ 0,7      |
|                    | 10                      | 53,0 $\pm$ 0,0     | 0,0 $\pm$ 0,0      |
|                    | 20                      | 53,5 $\pm$ 0,7     | 0,5 $\pm$ 0,7      |
|                    | 40                      | 53,5 $\pm$ 0,7     | 0,5 $\pm$ 0,7      |

## **ANEXO 2**





# Cofactors and metabolites as potential stabilizers of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases

Tânia G. Lucas<sup>a</sup>, Bárbara J. Henriques<sup>a</sup>, João V. Rodrigues<sup>a</sup>, Peter Bross<sup>b</sup>,  
Niels Gregersen<sup>b</sup>, Cláudio M. Gomes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal

<sup>b</sup> Research Unit for Molecular Medicine, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 15 July 2011

Received in revised form 14 September 2011

Accepted 15 September 2011

Available online 24 September 2011

### Keywords:

Fatty acid oxidation

Acyl-CoA dehydrogenase

Chemical chaperone

Differential scanning fluorimetry

Substrate

Thermofluor

## ABSTRACT

Protein misfolding is a hallmark of a number of metabolic diseases, in which fatty acid oxidation defects are included. The latter result from genetic deficiencies in transport proteins and enzymes of the mitochondrial  $\beta$ -oxidation, and milder disease conditions frequently result from conformational destabilization and decreased enzymatic function of the affected proteins. Small molecules which have the ability to raise the functional levels of the affected protein above a certain disease threshold are thus valuable tools for effective drug design. In this work we have investigated the effect of mitochondrial cofactors and metabolites as potential stabilizers in two  $\beta$ -oxidation acyl-CoA dehydrogenases: short chain acyl-CoA dehydrogenase and the medium chain acyl-CoA dehydrogenase as well as glutaryl-CoA dehydrogenase, which is involved in lysine and tryptophan metabolism. We found that near physiological concentrations (low micromolar) of FAD resulted in a spectacular enhancement of the thermal stabilities of these enzymes and prevented enzymatic activity loss during a 1 h incubation at 40 °C. A clear effect of the respective substrate, which was additive to that of the FAD effect, was also observed for short- and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase but not for glutaryl-CoA dehydrogenase. In conclusion, riboflavin may be beneficial during feverish crises in patients with short- and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase as well as in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiencies, and treatment with substrate analogs to butyryl- and octanoyl-CoAs could theoretically enhance enzyme activity for some enzyme proteins with inherited folding difficulties.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Acyl-CoA dehydrogenases (ACDH) constitute a protein family that in humans comprises 11 mitochondrial proteins. These proteins are involved in fatty acid oxidation and amino acid metabolism and comprise the short (SCAD), medium (MCAD), long (LCAD) and very-long (VLCAD) chain acyl-CoA dehydrogenases, ACAD9, ACAD10, ACAD11, isovaleryl-CoA dehydrogenase (IVD), short/branched chain acyl-CoA dehydrogenase (SBCAD), isobutyryl-CoA dehydrogenase (IBDH) and glutaryl-CoA dehydrogenase (GCD). These enzymes all share high sequence similarity, but differ in their substrate specificities. The electrons gained in the respective dehydrogenation reactions by all ACDH are transferred to the respiratory chain through electron transfer flavoprotein (ETF) and ETF:ubiquinone oxidoreductase (ETF:QO)

**Abbreviations:** ACDH, acyl-CoA dehydrogenases; SCAD, short chain acyl-CoA dehydrogenase; MCAD, medium chain acyl-CoA dehydrogenase; GCD, glutaryl-CoA dehydrogenase; FAD, flavin adenine dinucleotide; DSF, differential scanning fluorimetry;  $T_m$ , midpoint of thermal unfolding

\* Corresponding author at: ITQB/UNL. Av. República 127, 2780-756 Oeiras, Portugal. Tel.: +351 214469332; fax: +351 214411277.

E-mail address: [gomes@itqb.unl.pt](mailto:gomes@itqb.unl.pt) (C.M. Gomes).

URL: <http://www.itqb.unl.pt/pbfs> (C.M. Gomes).

[1–3]. These proteins share a common structural fold with two or four subunits forming homodimers or homotetramers which invariably harbor a FAD moiety as catalytic redox cofactor [4].

Genetic disorders in mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases involved in fatty acid oxidation (FAO) and amino acid metabolism are among the most common metabolic disorders. For example, MCAD deficiency is by far the most frequent disorder of this group with a frequency of 1:15,000 in Caucasian populations [5–7]. Newborn screening for many of these disorders is currently performed in many countries. Patients show a wide spectrum of symptoms, which in many cases are triggered by metabolic stress (high flux through the respective pathway) or pathophysiological conditions (e.g. fever), leading to further destabilization of mutant proteins with residual enzyme activity. Treatment regimes aiming at flux reduction by avoiding respective metabolites and their precursors in the diet have proved beneficial [8–9]. As many disease associated gene variations in the genes giving rise to variant proteins are of the missense type [10–11] the pathogenesis is in many cases resulting from defective folding [12]. As FAD has been shown to function as a chaperone [13–14], treatment with riboflavin, the precursor of FAD may theoretically increase the folding efficiency of mutant proteins with residual activity [15–16]. However, although riboflavin

treatment has been sporadically tried in acyl-CoA dehydrogenase deficiencies [8,17–19], no conclusive molecular studies addressing the mechanistic and structural basis of these effects on the dehydrogenase enzymes have been performed.

In the current work we have investigated the effects of addition of FAD, riboflavin or ACDH substrates and substrate analogs to study in detail the effects of these compounds on the *in vitro* structural stability of the two fatty acid oxidation ACDH, short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) and on glutaryl-CoA dehydrogenase (GCD), which is involved in amino acid metabolism. Our study can provide the basis for evidence-based mechanistic treatment strategies as it establishes the proof of principle for conformational and kinetic stabilization by cofactor and substrates in these proteins. Thus, treatment with substrate analogs to butyryl- and octanoyl-CoAs could theoretically enhance enzyme activity for some enzymes with inherited folding difficulties.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

All reagents were of the highest purity grade commercially available. Fatty acid substrates, FAD and riboflavin were purchased from Sigma. Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was purchased from VWR International.

### 2.2. ACDH expression and purification

Plasmids with MCAD, SCAD or GCD cDNA lacking the sequence encoding the mitochondrial transit peptide, and supplied with an N-terminal ATG start codon and a C-terminal his-tag (6xhis + 1xgln) were constructed in the same arrangement in a pBluescriptKS(–) (Stratagene) derived vector as described for the MCAD plasmid pWt described [20]. *Escherichia coli* JM109 cells (Promega) were transformed using standard procedures, and were grown in TB-medium (12 g Bacto tryptone, 24 g yeast extract, 9.4 g dipotassium phosphate, 2.2 g monopotassium phosphate and 2 ml glycerol per liter) supplemented with 100  $\mu$ g.ml<sup>–1</sup> ampicillin at 30 °C in a shaking incubator until OD<sub>532</sub> of 0.5 was reached. The cells were then induced overnight with 1 mM isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) [21]. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in 10 mM hepes, 20% ethylene glycol at pH 7.8, and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) in the presence of DNase (PVL) and FAD, and disrupted in a French press. The soluble fraction was subjected to a His-binding resin, 5 ml His-Trap HP (GE Healthcare), equilibrated in 10 mM hepes, 20% ethylene glycol, 200 mM NaCl, 10 mM imidazole and 0.5 mM PMSF at pH 7.8 (buffer A). The column was washed with five volumes of buffer A, and bound proteins were eluted by a linear gradient ranging from 10 to 500 mM imidazole, in buffer A. SCAD eluted as pure proteins at ~220 mM imidazole and MCAD and GCD eluted at ~160 mM imidazole. The purity of the pooled enzyme fractions was confirmed by SDS/PAGE. Pure fractions with 2.5 fold excess FAD were fast-frozen using liquid nitrogen and stored at –80 °C.

### 2.3. Biochemical and enzymatic assays

UV/visible spectra and enzymatic activities were measured using a Shimadzu UVPC-1601 spectrometer with cell stirring. Before each experiment FAD excess added to buffers as a preservative was removed by extensive washing using ultra filtration/dilution. Protein concentration was determined by the Bradford assay and FAD content was measured by the absorbance at 450 nm. All experiments were performed with pure proteins containing full occupancy of FAD site. Final buffer for protein assays was 10 mM hepes pH 7.8. The acyl-CoA dehydrogenase enzymatic activity was measured at 30 °C

monitoring 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) reduction at 600 nm, in an assay with phenazine methosulfate and butyryl-CoA, or octanoyl-CoA or glutaryl-CoA, respectively to SCAD, MCAD or GCD [22].

### 2.4. Differential scanning fluorimetry

Differential scanning fluorimetry (DSF) was used to determine the melting temperatures ( $T_m$ ) of the proteins under different conditions. This method is based on the use of the fluorophore Sypro Orange which becomes fluorescent upon binding to hydrophobic protein patches that get exposed upon thermal unfolding [23], being very useful to determine protein stability in a variety of conditions [24]. Briefly, different buffers or compound solution was distributed into PCR plates (Bio-Rad). Prior to measurements, protein solution (1.2  $\mu$ M) with Sypro Orange 5 $\times$  (Invitrogen) was added to each well. The plates were sealed with optical quality sealing tape (Bio-Rad) and run in an iCycler iQ Real-Time PCR instrument (Bio-Rad) using excitation filter from 530 to 560 nm and emission filter from 575 to 595. Temperature range used was from 20 to 90 °C, with increments of 2 °C.min<sup>–1</sup>. Raw data were exported to a spreadsheet, background corrected and the thermal denaturation curves obtained from which the midpoint transitions (melting temperatures,  $T_m$ ) have been determined for up to 96 different conditions in each assay. See Fig. S1 for a representative plot of melting curves determined by DSF.

### 2.5. Functional studies under thermal stress

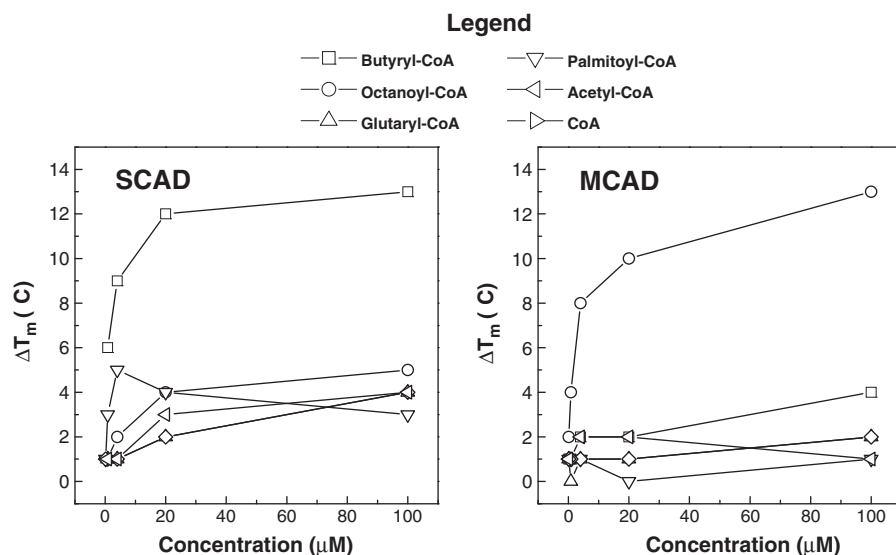
To study the effect of compounds on the biological activity of the model enzymes, activity was measured after heat stress. Briefly, ACDHs (1.2  $\mu$ M) were incubated for 1 h at 40 °C in the presence of the selected compounds: substrates (20  $\mu$ M) and/or FAD (20  $\mu$ M). Protein solution was added to the compound solution right before incubation at 40 °C. Control samples in the absence of the compounds were also prepared and treated in the same conditions. The enzymatic activity for each condition was determined immediately after mixing (time 0) and then after 1 h of incubation as described in the biochemical and enzymatic assay section. No protein precipitation was observed.

## 3. Results

### 3.1. Effect of acyl-CoA substrates on ACDH stability under physiological conditions

Cofactors, substrates and inhibitors are among small molecules which are known to have the potential to exert a direct stabilizing action over a protein fold by recovering misfolded conformations for example via nucleation effects which restore native interactions and/or promote the correct oligomeric state. Using differential scanning fluorescence (DSF) we have investigated *in vitro* the effect of diverse fatty acid substrates and related molecules on the stability of three ACDH: glutaryl-CoA dehydrogenase (GCD), short chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) and the medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD). In order to mimic conditions such as those found in mitochondria, we have used near physiological substrate concentrations [25], which were always present in assays at low micromolar concentrations (from 0.8 to 100  $\mu$ M). With this approach, we seek also to simulate conditions of mitochondrial ACDH dysfunction, in which substrate levels and metabolites are increased. For the purpose, we have screened the effect of butyryl-CoA, octanoyl-CoA, glutaryl-CoA, palmitoyl-CoA, acetyl-CoA and CoA, on the protein thermal stabilities and the melting temperatures ( $T_m$ ) were measured at increasing concentrations (Fig. 1 and Supplemental Fig. S1, Table S1). The results obtained showed that preferred substrates (butyryl-CoA and octanoyl-CoA, respectively) of SCAD and MCAD





**Fig. 1.** Dependence of substrate concentration on ACDH thermal stability. The thermal stabilities of SCAD and MCAD were determined by DSF in the presence of various compounds and substrates at different concentrations: butyryl-CoA (□), octanoyl (○), glutaryl-CoA (△), palmitoyl-CoA (▽), acetyl-CoA (<) and CoA (>). Plots show relative protein stability variations ( $\Delta T_m$ ) compared to controls in which the midpoint of thermal unfolding has been determined in the absence of any added compound ( $T_m = 50^\circ\text{C}$  for SCAD and  $T_m = 54^\circ\text{C}$  MCAD). Protein concentration was  $1.2\ \mu\text{M}$  and compound concentration varied between  $0.16$  and  $100\ \mu\text{M}$ , in  $10\ \text{mM}$  hepes pH 7.8. See [Materials and methods](#) for details and supplementary materials for tables.

have a dramatic effect on the thermal stability affording a substantial stabilization ( $\Delta T_m \approx +12^\circ\text{C}$ ). Interestingly, this stabilization is achieved even at very low concentrations and already at  $20\ \mu\text{M}$  more than 80% of the maximal stabilizing effect observed at higher substrate concentrations ( $100\ \mu\text{M}$ ) is achieved. For these two proteins, although the most significant effect is limited to the preferred catalytic substrate, some stabilization with lower magnitude ( $\Delta T_m < 4^\circ\text{C}$ ) is also observed for the other molecules tested. However, substrate-induced conformational stabilization does not seem to be a property shared by acyl-CoA dehydrogenases in general, as we did not observe any effect of glutaryl-CoA on GCD (Table S1). These differences observed in respect to substrate stabilization among ACDHs suggest that these proteins, although sharing a common structural fold, can in fact have their conformational properties modulated by distinct mechanisms, a process which possibly relates to differences in protein dynamics (discussed below). The substrate-induced stabilization effects observed for SCAD and MCAD are thus suggestive of a stabilizing mechanism through which local effects resulting from substrate binding to the active site are globally propagated to the protein.

### 3.2. FAD but not its precursor riboflavin stabilizes ACDH

We then set to investigate if FAD, the common flavin cofactor present in all acyl-CoA dehydrogenases, has also a stabilizing action over the ACDH proteins. We had previously established that a slight excess of FAD, similar to that found in patients undergoing riboflavin supplementation therapy [26], has an important stabilizing effect over the electron transfer flavoprotein (ETF) under mild thermal stress mimicking a fever episode, even under conditions in which the protein cofactor site is fully saturated [14]. We have now extended this analysis to the three acyl-CoA dehydrogenases here studied, and for the purpose the DSF assays of the different proteins (at  $1.2\ \mu\text{M}$  final concentration) were performed in the presence of a slight excess of FAD at concentrations from  $3$  to  $25\ \mu\text{M}$ . Importantly, it should be noted that the as purified proteins had already fully loaded flavin binding sites ( $>0.9\ \text{FAD/mol}$ ). The results obtained show that FAD has a stabilizing effect on SCAD, MCAD and GCD, resulting in considerable increases of the  $T_m$  (Fig. 2, Table S2). In order to investigate if this stabilization is specific for FAD or if, on the other hand, isoxanthine-ring mediated interactions could promote an identical effect, we have carried out

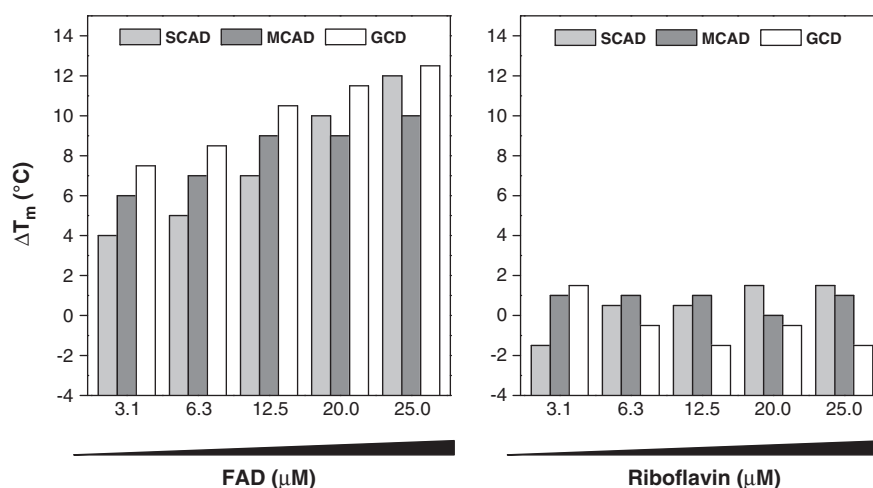
experiments using riboflavin. In these cases, no stabilization was observed thus showing that at the concentrations and conditions tested, the stabilization is not afforded generically by any flavin moiety, but rather it is specific for FAD.

### 3.3. The combination of cofactor and substrate stabilization is nearly additive

Having established that mitochondrial cofactors and metabolites are potential stabilizers of native  $\beta$ -oxidation flavoprotein dehydrogenases, we have investigated for possible synergistic effects. For the purpose, we have analyzed SCAD without FAD added in parallel with assays in which a moderate excess of FAD ( $20\ \mu\text{M}$ ) was included in the assay solution; for all these conditions the additional effects of substrates were analyzed (Fig. 3, Table S3). The results obtained show that i) the tested combinations of compounds stabilize SCAD; and ii) the stabilization achieved is nearly additive in respect to that observed in experiments in which the effect of the molecules has been tested individually (Fig. 3). This observation agrees with the results described in the previous sections of this study as it confirms that substrates and the cofactor result in protein stabilization via different mechanisms: the former by binding to the active site pocket, and the latter by shifting the dissociation equilibrium of the redox cofactor toward the protein bound state. What is very interesting to note is that the combination of butyryl-CoA and FAD increases substantially the melting temperature of SCAD. This illustrates how the conformation of an ACDH can be effectively rescued by small molecule ligands, in this case natural mitochondrial metabolites at very low concentrations.

### 3.4. Cofactors and metabolites prevent activity loss during mild temperature stress

In order to be truly effective, protein stabilization by small molecules must not compromise the biological activity. In some cases, a substantial increase in the protein melting temperature corresponds to a rigidification of the protein structure leading to decreased dynamics and flexibility, thus compromising biological activity [27]. An adequate stability-activity balance must thus be attained so that a better protein conformation is not obtained at the expense of a



**Fig. 2.** Effect of FAD and riboflavin on ACDH thermal stability. The effect of FAD and riboflavin at different concentrations on the thermal stabilities of SCAD, MCAD and GCD (1.2  $\mu\text{M}$ ) was determined at various flavin concentrations (3.1 to 25  $\mu\text{M}$ ) in 10 mM hepes pH 7.8. Proteins were added to flavin solutions right before the analysis. Bars denote protein stability variations ( $\Delta T_m$ ) in respect to controls. Please note that the x-axis is not crossing at  $y = 0$ . See [Materials and methods](#) for details and supplementary materials for tables.

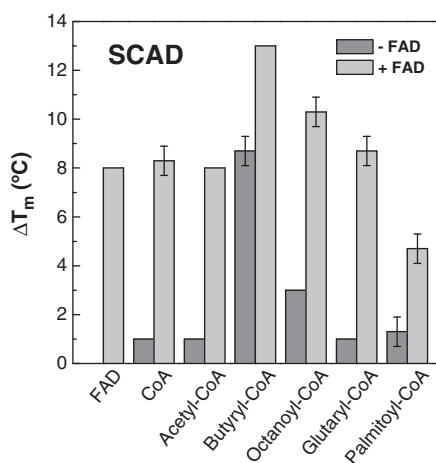
trade off with enzymatic activity. In order to investigate this possibility we have carried out experiments in which GCD, MCAD and SCAD were incubated for 1 h at 40 °C with and without FAD, in combination with butyryl-CoA, octanoyl-CoA and glutaryl-CoA. After this period, which simulates a mild temperature stress resembling a fever episode, the remaining enzymatic activity was measured. The results obtained in control experiments without added molecules show that these are rather destabilizing conditions as after this incubation the enzymes had low residual activities: 48% for GCD, 31% for MCAD and 49% for SCAD (Fig. 4, Table S4). For all cases, this activity decay was prevented if FAD was present at low concentrations (20  $\mu\text{M}$ ) during the thermal stress. Likewise, the preferred substrates (octanoyl-CoA for MCAD and butyryl-CoA for SCAD) also prevent activity loss and, when in combination with the flavin cofactor, an enzymatic activation is observed. These results are in agreement with the increased melting temperatures and show that the conformational stabilization does not sacrifice catalytic activity. In this respect, it is interesting to note that non-optimal substrates withheld activity during the temperature stress assay at 40 °C. This is for example the case of butyryl-CoA for MCAD: at 20  $\mu\text{M}$  it yields a modest increase in the melting

temperature ( $\Delta T_m \approx +2$  °C), but under identical conditions it prevents activity loss during 1 h incubation at 40 °C, affording a residual activity of 70% (versus 30% in its absence). On the other hand, glutaryl-CoA, which is not a substrate for either SCAD or MCAD has no preventive effect.

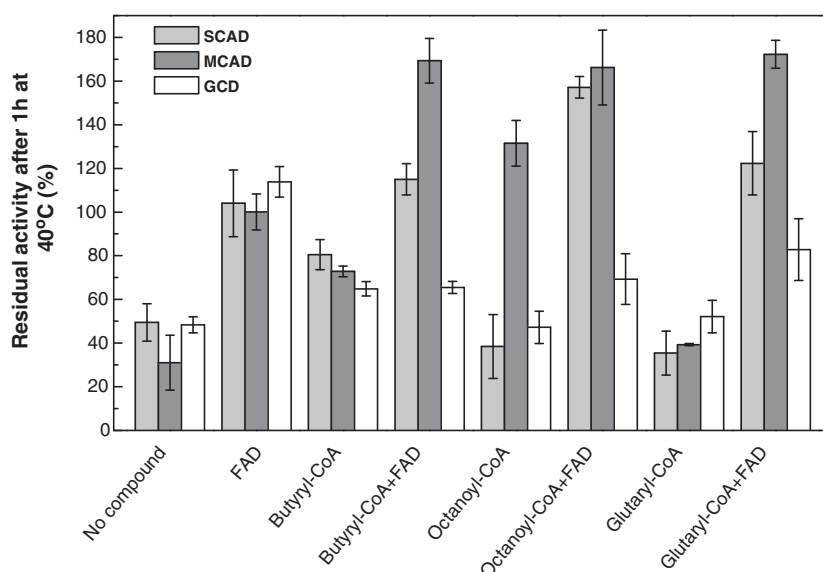
#### 4. Discussion

In this study we have investigated the effect of mitochondrial cofactors and metabolites as potential stabilizers in three acyl-CoA dehydrogenases: GCD, SCAD and MCAD. The rationale for the study was based on the principle that ligands and substrates that increase protein stability and function could in theory be used as small molecule pharmacological chaperones, restoring levels of the affected proteins above critical disease thresholds in the associated metabolic pathologies. We have tested the hypothesis that metabolites and cofactors at micromolar physiological concentrations could play this role, and we have undertaken two complementary approaches: on the one hand testing effects on protein stabilization, and, on the other, testing effects on the protein kinetic stability upon an *in vitro* fever simulation.

Our results show that for MCAD and SCAD, the preferred substrates and the FAD cofactor have a dramatic stabilizing effect, increasing the protein thermal stability and preventing activity loss during a mild temperature stress. Interestingly, GCD substrate binding does not seem to be coupled with overall fold stabilization, whereas the FAD cofactor clearly does. This suggests that substrate-binding in GCD may result in a somehow different set of conformational changes that do not yield effective stabilization as observed in MCAD and SCAD, which reflects differences among the dynamic properties of these enzymes. In the case of SCAD, cofactor and substrate synergistically restore stability and catalytic activity. Thus, these results clearly establish the proof of principle that cofactors and metabolites at physiological levels are potential stabilizers of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases. The fact that these substantial effects take place at near physiological concentrations of the compounds, which have the same magnitude as the  $K_m$  for the most effective enzyme–substrate pairs, strongly suggests that the maintenance of a high active site occupancy is an effective stabilizing strategy for SCAD and MCAD. Interesting to note is the fact that in the case of SCAD patients there is accumulation of butyryl-CoA byproducts such as ethylmalonic acid (EMA) in the cells, blood and urine [28–30]. Therefore, patients could potentially benefit of a treatment that would increase the intra-mitochondrial level of butyryl-CoA or by a substrate analog which would have the ability to stabilize the enzyme. The



**Fig. 3.** Combined effect of FAD and metabolites on SCAD stability. The thermal stabilities of SCAD (1.2  $\mu\text{M}$ ) in the presence of CoA, acetyl-CoA, butyryl-CoA, octanoyl-CoA, glutaryl-CoA or palmitoyl-CoA (20  $\mu\text{M}$ ) were determined in the presence and absence of FAD (20  $\mu\text{M}$ ). Protein was added to flavin and metabolite solutions right before the analysis. Bars denote protein stability variations ( $\Delta T_m$ ) in respect to controls. See [Materials and methods](#) for details and supplementary materials for tables.



**Fig. 4.** Rescue of ACDH activity following thermal stress by metabolites and FAD. The residual activity after thermal stress (1 h at 40 °C) was determined for GCD, MCAD, and SCAD with no compound added or in the presence of FAD (20 μM), and butyryl-CoA, octanoyl-CoA and glutaryl-CoA (20 μM), the latter also in combination with FAD (20 μM). Protein was added to the solutions right before the incubation at 40 °C (final concentration was 1.2 μM). Values for residual activity were calculated in relation to activity at time zero, for each condition. See [Materials and methods](#) for details and supplementary materials for tables.

competition effect of a substrate analog over the native substrate would be overcome by the fact that its binding would increase protein stabilization and result in a higher level of correctly folded protein in the mitochondria with extended lifetime, thus surpassing a certain functional threshold below which there is dysfunction and disease. Thus developing such substrate analog compounds would be potentially beneficial to patients. In fact the same role could be played by inhibitors, such as in the case of those that have been developed and are used therapeutically to treat for example lysosomal disorders, such as Gaucher disease. In the latter case, inhibitor molecules bind to folding variants of the affected glucocerebrosidase enzyme, increasing their thermodynamic and kinetic stability, thus favoring their correct trafficking and an increase of enzymatic function above a critical disease threshold [31–32]. Other relevant modes of pharmacological rescue of metabolic disorders focus on increasing protein expression levels, which could also be a possibility in respect to increasing the levels of enzyme, even if partially catalytically impaired. As an example, bezafibrate was shown to induce both mRNA and protein expression levels of VLCAD and CPTII in deficient fibroblast [33], and has also proved to be effective in patients [34].

In the present case, the highly stabilizing effect of FAD is suggestive of a direct effect in the proteins, which corroborates the view that dietary administration of high doses of the riboflavin precursor results in an intracellular increase in FAD levels [26] is in fact potentially beneficial for patients suffering from inherited acyl-CoA dehydrogenase deficiencies. Although comprehensive studies on the clinical effects of high-dose riboflavin treatments are scarce, data from a subgroup of patients with SCAD deficiency is not conclusive in respect to establishing a clear relationship between high-dose riboflavin treatments and clinical improvements, therefore broader and more complete studies are needed [18]. Nevertheless, the biochemical improvements resulting from increased FAD levels, as a result of vitamin therapy are well established, and point to a pivotal role for this cofactor. Even low FAD:protein ratios substantially improve protein stability and sustain enzymatic activity, and presumably the same effect takes place in disease-associated variants. One could speculate if whether FAD could be a general regulator of  $\beta$ -oxidation. Under this hypothetical scenario, increased steady-state levels of  $\beta$ -oxidation enzymes could be induced by high FAD concentrations, both as a result of a direct stimulatory effect of FAD over translation

[35] and also by significant increase in protein stability promoted by FAD, that would inhibit protease-mediated protein degradation. Future experiments will contribute to clarify this hypothesis.

The data here collected suggests that cofactor dissociation during thermal stress may be compensated by exogenous FAD, which can be provided by riboflavin treatment [26]. The relevance of our observations is that a very significant stabilization is achieved at FAD concentrations (20 μM) which are within the physiological cellular range [25]. This stabilization effect arises probably from a shift in the equilibrium between bound and unbound cofactors, in the direction that favors the bound form resulting in an improvement of the stability of the protein. Important to note is that in our experiments the initial proteins had 95% occupancy of the flavin binding site; therefore, FAD is stabilizing the holo form of the protein, in contrast with the well described stabilization of apo forms by respective cofactors. Mechanistically, the effect of FAD might be interpreted in respect to the principle of ligand-based kinetic stabilization; the availability of the FAD cofactor results in an equilibrium shift toward the bound state, further promoted by the fact that binding of a molecule to the active pocket contributes to the kinetic stability of the protein conformation, which further increases the end-point residual activity.

With this study we provide a quantitative measure for the FAD-dependent stability of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases, through saturation of the flavin binding site yielding conformational and structural stabilization, therefore providing a framework that explains the fact that mature acyl-CoA dehydrogenases undergo fast degradation under flavin-depletion [35]. Therefore, riboflavin may be beneficial during feverish crises in patients with the short- and the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase as well as in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiencies, and treatment with substrate analogs to butyryl- and octanoyl-CoAs could theoretically enhance enzyme activity for some enzyme proteins with inherited folding difficulties. Future research will contribute to clarify this possibility.

## Acknowledgements

The work was supported by funds from the Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT/MCTES, Portugal) via research grant PTDC/SAU-GMG/70033/2006 (to C. M. G.) and by CLIMB UK – Children living with metabolic disease (to C. M. G.). The Fundação para a

Ciência e Tecnologia (FCT/MCTES, Portugal) is acknowledged for fellowships BII – Bolsa de Iniciação à Investigação (to T. G. L.), SFRH/BPD/74475/2010 (to B. J. H.) and SFRH/BPD/34763/2007 (to J.V.R.). The Alfred Benzon Foundation is acknowledged for an interchange grant.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.bbadis.2011.09.009](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.09.009).

## References

- [1] D.L. Roberts, F.E. Frerman, J.J. Kim, Three-dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1-Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 14355–14360.
- [2] J. Zhang, F.E. Frerman, J.J. Kim, Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 16212–16217.
- [3] S. Ghisla, C. Thorpe, Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 494–508.
- [4] J.J. Kim, R. Miura, Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases. Structural basis for mechanistic similarities and differences, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 483–493.
- [5] G.F. Hoffmann, R. von Kries, D. Klose, M. Lindner, A. Schulze, A.C. Muntau, W. Roschinger, B. Liebl, E. Mayatepek, A.A. Roscher, Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany, *Eur. J. Pediatr.* 163 (2004) 76–80.
- [6] E.M. Maier, B. Liebl, W. Roschinger, U. Nennstiel-Ratzel, R. Fingerhut, B. Olgemöller, U. Busch, N. Krone, R. v. Kries, A.A. Roscher, Population spectrum of ACADM genotypes correlated to biochemical phenotypes in newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, *Hum. Mutat.* 25 (2005) 443–452.
- [7] B.S. Andresen, S.F. Dobrowolski, L. O'Reilly, J. Muenzer, S.E. McCandless, D.M. Frazier, S. Udvary, P. Bross, I. Knudsen, R. Banas, D.H. Chace, P. Engel, E.W. Naylor, N. Gregersen, Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) mutations identified by MS/MS-based prospective screening of newborns differ from those observed in patients with clinical symptoms: identification and characterization of a new, prevalent mutation that results in mild MCAD deficiency, *Am. J. Hum. Genet.* 68 (2001) 1408–1418.
- [8] S. Kolker, E. Christensen, J.V. Leonard, C.R. Greenberg, A. Boneh, A.B. Burlina, A.P. Burlina, M. Dixon, M. Duran, A. Garcia Cazorla, S.I. Goodman, D.M. Koeller, M. Kyllerman, C. Muhlhäuser, E. Müller, J.G. Okun, B. Wilcken, G.F. Hoffmann, P. Burgard, Diagnosis and management of glutaric aciduria type I – revised recommendations, *J. Inher. Metab. Dis.* 34 (2011) 677–694.
- [9] R.S. Rector, J.A. Ibdah, Fatty acid oxidation disorders: maternal health and neonatal outcomes, *Semin. Fetal Neonatal Med.* 15 (2010) 122–128.
- [10] B. Keyser, C. Muhlhäuser, A. Dickmanns, E. Christensen, N. Muschol, K. Ullrich, T. Braulke, Disease-causing missense mutations affect enzymatic activity, stability and oligomerization of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH), *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008) 3854–3863.
- [11] N. Gregersen, B.S. Andresen, C.B. Pedersen, R.K. Olsen, T.J. Corydon, P. Bross, Mitochondrial fatty acid oxidation defects—remaining challenges, *J. Inher. Metab. Dis.* 31 (2008) 643–657.
- [12] N. Gregersen, P. Bross, S. Vang, J.H. Christensen, Protein misfolding and human disease, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7 (2006) 103–124.
- [13] T. Saijo, K. Tanaka, Isoalloxazine ring of FAD is required for the formation of the core in the Hsp60-assisted folding of medium chain acyl-CoA dehydrogenase subunit into the assembly competent conformation in mitochondria, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 1899–1907.
- [14] B.J. Henriques, J.V. Rodrigues, R.K. Olsen, P. Bross, C.M. Gomes, Role of flavinylation in a mild variant of multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency: a molecular rationale for the effects of riboflavin supplementation, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 4222–4229.
- [15] P. Leandro, C.M. Gomes, Protein misfolding in conformational disorders: rescue of folding defects and chemical chaperoning, *Mini Rev. Med. Chem.* 8 (2008) 901–911.
- [16] B.J. Henriques, R.K. Olsen, P. Bross, C.M. Gomes, Emerging roles for riboflavin in functional rescue of mitochondrial beta-oxidation flavoenzymes, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 3842–3854.
- [17] M. Duran, C.B.J.M. Cleutjens, D. Ketting, L. Dorland, J.B.C. Dekker, F.J. Vansprang, R. Berger, Diagnosis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficiency in lymphocytes and liver by a gas-chromatographic method – the effect of oral riboflavin supplementation, *Pediatr. Res.* 31 (1992) 39–42.
- [18] B.T. van Maldegem, M. Duran, R.J.A. Wanders, H.R. Waterham, F.A. Wijburg, Flavin adenine dinucleotide status and the effects of high-dose riboflavin treatment in short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, *Pediatr. Res.* 67 (2010) 304–308.
- [19] N.J. Brandt, N. Gregersen, E. Christensen, I.H. Gron, K. Rasmussen, Treatment of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria). Experience with diet, riboflavin, and GABA analogue, *J. Pediatr.* 94 (1979) 669–673.
- [20] P. Bross, C. Jespersen, T.G. Jensen, B.S. Andresen, M.J. Kristensen, V. Winter, A. Nandy, F. Krautle, S. Ghisla, L. Bolund, J.J. Kim, N. Gregersen, Effects of two mutations detected in medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)-deficient patients on folding, oligomer assembly, and stability of MCAD enzyme, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 10284–10290.
- [21] T.V. Nguyen, C. Riggs, D. Babovic-Vuksanovic, Y.S. Kim, J.F. Carpenter, T.P. Burghardt, N. Gregersen, J. Vockley, Purification and characterization of two polymorphic variants of short chain acyl-CoA dehydrogenase reveal reduction of catalytic activity and stability of the Gly185Ser enzyme, *Biochemistry* 41 (2002) 11126–11133.
- [22] C. Thorpe, R.G. Matthews, C.H. Williams, Jr., Acyl-coenzyme A dehydrogenase from pig kidney, Purification and properties, *Biochemistry* 18 (1979) 331–337.
- [23] F.H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 2212–2221.
- [24] J.V. Rodrigues, V. Prosiński, I. Marrucho, L.P. Rebelo, C.M. Gomes, Protein stability in an ionic liquid milieu: on the use of differential scanning fluorimetry, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 13614–13616.
- [25] B.D. Bennett, E.H. Kimball, M. Gao, R. Osterhout, S.J. Van Dien, J.D. Rabinowitz, Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*, *Nat. Chem. Biol.* 5 (2009) 593–599.
- [26] E. Gianazza, L. Vergani, R. Wait, C. Brizio, D. Brambilla, S. Begum, T.A. Giancaspero, F. Conserva, I. Eberini, D. Bufano, C. Angelini, E. Pegoraro, A. Tramontano, M. Barile, Coordinated and reversible reduction of enzymes involved in terminal oxidative metabolism in skeletal muscle mitochondria from a riboflavin-responsive, multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency patient, *Electrophoresis* 27 (2006) 1182–1198.
- [27] A.R. Correia, T. Wang, E.A. Craig, C.M. Gomes, Iron-binding activity in yeast frataxin entails a trade off with stability in the alpha1/beta1 acidic ridge region, *Biochem. J.* 426 (2010) 197–203.
- [28] N. Gregersen, V.S. Winter, M.J. Corydon, T.J. Corydon, P. Rinaldo, A. Ribes, G. Martinez, M.J. Bennett, C. Vianey-Saban, A. Bhala, D.E. Hale, W. Lehnert, S. Knoch, M. Roig, E. Riudor, H. Eiberg, B.S. Andresen, P. Bross, L.A. Bolund, S. Kolvraa, Identification of four new mutations in the short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) gene in two patients: one of the variant alleles, 511C→T, is present at an unexpectedly high frequency in the general population, as was the case for 625G→A, together conferring susceptibility to ethylmalonic aciduria, *Hum. Mol. Genet.* 7 (1998) 619–627.
- [29] C.B. Pedersen, Z. Zolkipli, S. Vang, J. Palmfeldt, M. Kjeldsen, V. Stenbroen, S.P. Schmidt, R.J. Wanders, J.P. Ruiter, F. Wibrand, I. Tein, N. Gregersen, Antioxidant dysfunction: potential risk for neurotoxicity in ethylmalonic aciduria, *J. Inher. Metab. Dis.* 33 (2010) 211–222.
- [30] R. Jethva, M.J. Bennett, J. Vockley, Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 95 (2008) 195–200.
- [31] W. Zheng, J. Padia, D.J. Urban, A. Jadhav, O. Goker-Alpan, A. Simeonov, E. Goldin, D. Auld, M.E. LaMarca, J. Inglese, C.P. Austin, E. Sidransky, Three classes of glucocerebrosidase inhibitors identified by quantitative high-throughput screening are chaperone leads for Gaucher disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007) 13192–13197.
- [32] Z. Yu, A.R. Sawkar, J.W. Kelly, Pharmacologic chaperoning as a strategy to treat Gaucher disease, *FEBS J.* 274 (2007) 4944–4950.
- [33] F. Djouadi, F. Aubey, D. Schlemmer, J.P. Ruiter, R.J. Wanders, A.W. Strauss, J. Bastin, Bezafibrate increases very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase protein and mRNA expression in deficient fibroblasts and is a potential therapy for fatty acid oxidation disorders, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 2695–2703.
- [34] J.P. Bonnefont, J. Bastin, A. Behin, F. Djouadi, Bezafibrate for an inborn mitochondrial beta-oxidation defect, *N. Engl. J. Med.* 360 (2009) 838–840.
- [35] M. Nagao, K. Tanaka, FAD-dependent regulation of transcription, translation, post-translational processing, and post-processing stability of various mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases and of electron transfer flavoprotein and the site of holoenzyme formation, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 17925–17932.